

**„Untersuchungen zur Wirksamkeit eines Surfactant Protein B/Urokinase  
Fusionsproteins (SPUC) in transgenen Mäusen am Bleomycinmodell der  
Lungenfibrose“**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Rathmann, Heiko  
aus Wittmund  
Gießen 2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Gutachter: Prof. Dr. Andreas Günther**

**Gutachter: Prof. Dr. Ludger Fink**

**Tag der Disputation: 08.05.2019**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>S.1</b>
1.1. <u>Interstitielle Lungenerkrankungen</u>	S.1
1.1.1. Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonien	S.2
1.1.2. Klinik und Diagnostik der idiopathischen interstitiellen Pneumonien	S.3
1.2. <u>Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)</u>	S.6
1.2.1. Epidemiologie der idiopathischen pulmonalen Fibrose	S.7
1.2.2. Symptomatik und Verlauf der idiopathischen pulmonalen Fibrose	S.8
1.2.3. Diagnosestellung der idiopathischen pulmonalen Fibrose	S.9
1.2.4. Pathomechanismen der idiopathischen pulmonalen Fibrose	S.10
1.2.5. Therapie der idiopathischen pulmonalen Fibrose	S.15
1.3. <u>Pulmonaler Surfactant</u>	S.16
1.3.1. Zusammensetzung des Surfactants	S.17
1.3.2. Funktion und Pathophysiologie des Surfactants	S.19
1.4. <u>Das Gerinnungssystem und die Fibrinolyse</u>	S.23
1.4.1. Das Gerinnungssystem	S.23
1.4.2. Fibrinolyse	S.25
1.4.3. Urokinase	S.27
1.5. Interaktion des Gerinnungssystems mit pulmonalem Surfactant und Rationale für ein Surfactant Protein B/Urokinase Fusionsprotein (SPUC)	S.29
<b>2. <u>Fragestellung</u></b>	<b>S.33</b>
<b>3. <u>Material und Methoden</u></b>	<b>S.34</b>
3.1. <u>Material</u>	S.34
3.1.1. Versuchstiere	S.34
3.1.2. Tierversuchsgenehmigung	S.36
3.1.3. Injektionslösungen und Substanzen	S.36
3.1.4. Tierexperiment	S.36
3.1.5. Histologie	S.38
3.1.6. Hydroxyprolinanalyse	S.40

3.1.7	Sonstiges	S.41
3.2.	<u>Methoden</u>	<u>S.42</u>
3.2.1.	Bleomycinapplikation	S.42
3.2.2.	Gewicht	S.42
3.2.3.	Compliancemessung und Probengewinnung	S.42
3.2.4.	Histologie	S.44
3.2.5.	Quantitative histologische Auswertung	S.46
3.2.6.	Hydroxyprolinanalyse	S.48
3.2.7.	Statistik	S.49
4.	<u><b>Ergebnisse</b></u>	<u><b>S.50</b></u>
4.1.	Überlebensrate	S.51
4.2.	Gewicht	S.52
4.3.	<u>Histologie und bildanalytische Quantifizierung</u>	<u>S.54</u>
4.3.1.	Histologische Beurteilung	S.54
4.3.2.	Septendicke und Alveolengröße	S.59
4.3.3.	Häufigkeitsverteilung der Septendicke und der Alveolengröße	S.61
4.4.	Zelldifferenzierung	S.63
4.5.	Compliance	S.64
4.6.	Hydroxyprolinbestimmung	S.66
5.	<u><b>Diskussion</b></u>	<u><b>S.68</b></u>
6.	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	<b>S.77</b>
7.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>S.80</b>
8.	<b>Darstellungsverzeichnis</b>	<b>S.83</b>
9.	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>S.85</b>
10.	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>S.106</b>
11.	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>S.107</b>
12.	<b>Danksagung</b>	<b>S.108</b>
13.	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>S.109</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Interstitielle Lungenerkrankungen

Die interstitiellen Lungenerkrankungen (*interstitial lung disease*, ILD) bezeichnen eine Gruppe von Erkrankungen, die mit einem bindegewebigen Umbau des Alveolargerüsts einhergehen und deren Endstrecke eine Lungenfibrose darstellt. Ebenfalls gebräuchlich ist der Begriff der diffusen Lungenparenchymerkrankung (*diffuse parenchymal lung disease*, DPLD). Es handelt sich dabei um eine heterogene Gruppe von über 100 verschiedenen Erkrankungen, die sich vor allem am Lungengerüst, dem Interstitium mit seinen Kapillaren und im angrenzenden Alveolarraum abspielen [American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002]. Im Verlauf kommt es dann zu typischen Veränderungen, wie einer Fibroblastenproliferation und einer damit einhergehenden Kollagenanreicherung im Lungengerüst, die zu einem fibrotischen, teilweise auch irreversiblen Umbau des zarten Alveolargerüsts führen. Als Folge der Verdickung der Diffusionsstrecke (Alveolare-Interstitium-Kapillare) kann den Anforderungen des Gasaustausches nicht mehr Rechnung getragen werden [Crystal, 1981].

Der häufigste Vertreter ist die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), gleichzeitig auch die Erkrankung mit dem schwerwiegendsten Verlauf und der schlechtesten Prognose bei unbekannter Ursache [Behr, 2013]. Es gibt jedoch auch eine Reihe an Formen der interstitiellen Lungenerkrankungen bei denen der Auslöser bekannt ist. Hierzu zählen berufs- und umweltbedingte anorganische Stäube (z.B. Asbestose, Silikose, Berylliose und andere Pneumokoniosen), oder organische Stäube wie bei der exogenen allergischen Alveolitis. Auch Medikamente (z.B. Amiodaron, Bleomycin), ionisierende Strahlung oder verschiedene Erreger wie *Pneumocystis jiroveci* können ursächlich sein. In manchen Fällen, insbesondere wenn chronische Entzündungsreize verantwortlich sind, sind die Lungenveränderungen ganz oder teilweise reversibel und können daher auch kurativ therapiert werden. Bei vielen Formen der ist der Umbau des Lungengerüsts jedoch irreversibel und mündet in die Ausbildung einer sogenannten Honigwabenhunde (*honey combing*) [Behr, 2013].

### 1.1.1. Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonien

Die Idiopathischen Interstitiellen Pneumonien (IIP) stellen eine häufige und bedeutende Erkrankungsgruppe innerhalb der DPLD dar, deren gemeinsames Kennzeichen eine unbekannte Ätiologie und in vielen Fällen das terminale Krankheitsbild einer fibrotisch umgebauten Lunge mit Ausbildung einer Honigwabenstruktur sind [Behr, 2013]. Die gebräuchlichste Klassifikation der IIPs erfolgt aktuell nach den Leitlinien der amerikanischen und europäischen Fachgesellschaft für Lungenerkrankungen (*American Thoracic Society, ATS, / European Respiratory Society, ERS*) aus dem Jahre 2002, die 2011 und 2013 aktualisiert wurden [Travis, 2013].

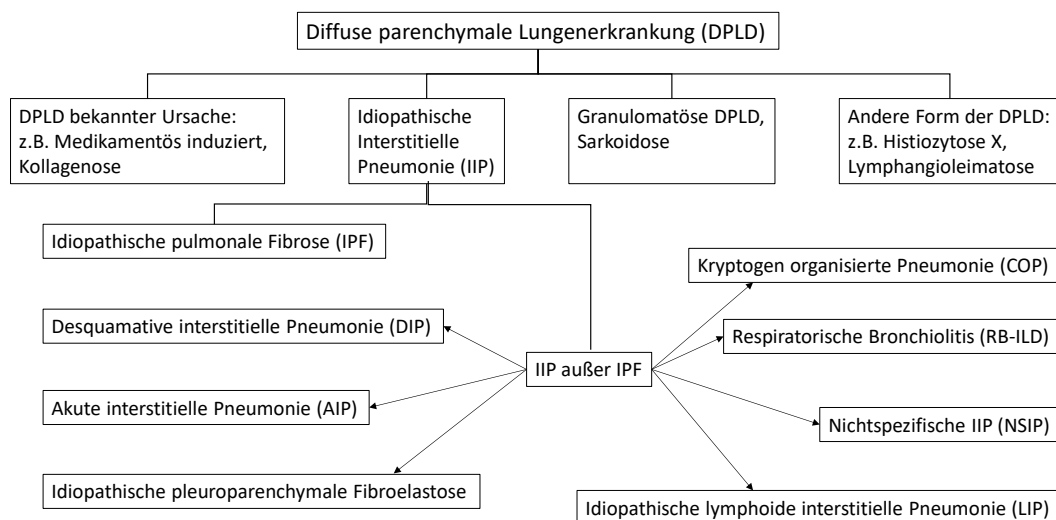
Hiernach werden acht Formen der idiopathischen interstitiellen Pneumonie interdisziplinär differenziert. Vor allem die Histologie und das HR-CT spielen bei der Einteilung eine große Rolle. Durch heutige Techniken wie die bronchoskopisch durchgeführte Kryobiopsie und die videoassistierte Thorakoskopie (VATS) wird der Probengewinnung leichter und für den Patienten weniger risikoreich.

Unterschieden werden:

1. Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)
2. Nichtspezifische idiopathische interstitielle Pneumonie (NSIP)
3. Respiratorische Bronchiolitis (RB-ILD)
4. Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)
5. Kryptogen organisierte Pneumonie (COP)
6. Akute interstitielle Pneumonie (AIP)
7. Idiopathische lymphoide interstitielle Pneumonie (LIP)
8. Idiopathische pleuroparenchymale Fibroelastose

Kann die IIP keinem der hier aufgeführten Formen zugeordnet werden, wird sie unter dem Begriff „unklassifizierbar idiopathische interstitielle Pneumonie“ geführt.

Dabei zählen die Entitäten 1-6 zu den häufigen und die Entitäten 7-8 zu den seltenen idiopathischen interstitiellen Pneumonien [Travis, 2013].

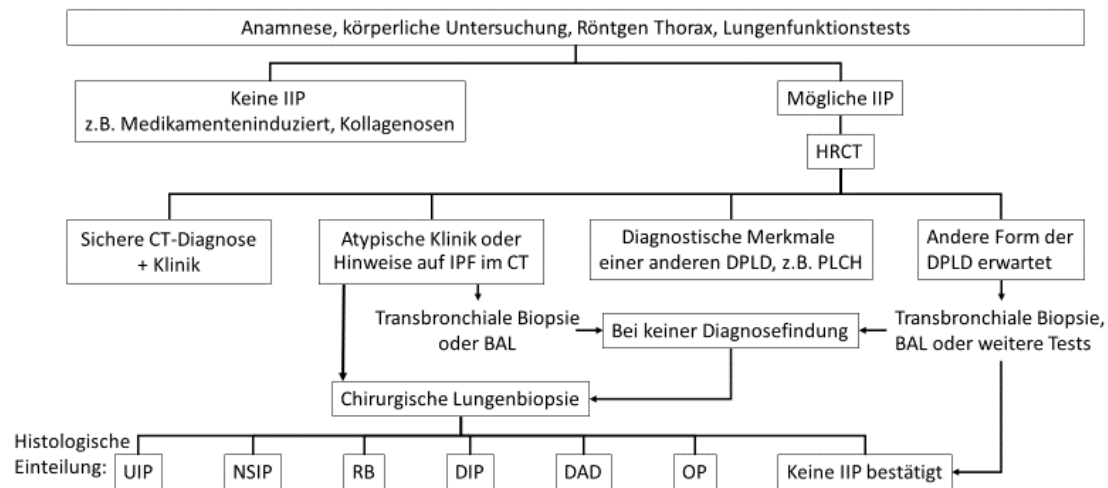


**Abb. 1: Klassifikation der Diffus Parenchymatösen Lungenerkrankungen (DPLD), modifiziert nach [American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002]**

### 1.1.2. Klinik und Diagnostik der idiopathischen interstitiellen Pneumonien

Das Krankheitsbild der idiopathischen interstitiellen Pneumonien beginnt häufig mit einer unklaren Belastungsdyspnoe, die im Verlauf in eine Ruhedyspnoe mit Tachypnoe übergeht. Häufig kommt es zu einem trockenen unproduktiven Reizhusten. Auskultatorisch imponiert ein inspiratorisches basales Knisterrasseln mit Sklerophonie. In fortgeschrittenen Stadien auch einhergehend mit knarrenden Geräuschen, sogenanntem „Korkenreiben“. Bei der Inspektion können typische Zeichen der Atemwegserkrankungen wie Trommelschlägelfinger, Uhrglasnägel und Zyanose, sowie Zeichen eines Cor pulmonale imponieren. Die Atmung ist häufig abgeflacht und es kommt zur Tachypnoe. Bei tiefer Inspiration kommt es zum „Door-stop“-Phänomen, einem plötzlichen Atemstop. Perkutorisch kann man hochstehende Lungengrenze mit geringer Verschieblichkeit herausarbeiten [Herold, 2012; Behr, 2013].

Zu Beginn der Abklärung stehen Standards wie die körperliche Untersuchung und die Testung der Lungenfunktion, in der es Hinweise auf eine restriktive Lungenfunktionsstörung gibt (Vitalkapazität und totale Lungenkapazität vermindert). Die Diffusionskapazität ist ebenfalls häufig erniedrigt [Herold, 2012; Behr, 2013]. Bei der weiteren Diagnostik spielt aktuell vor allem das HRCT mit dem Nachweis eines UIP-Musters eine Rolle [Behr, 2013].



**Abb. 2: Diagnoseprozess bei Diffus Parenchymatösen Lungenerkrankungen (DPLD), modifiziert nach [American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002]**

Abkürzungen: IPF = „*idiopathic pulmonary fibrosis*“, IIP = „*idiopathic interstitial pneumonias*“, UIP = „*usual interstitial pneumonia*“, NSIP = „*idiopathic nonspecific pneumonia*“, RB = „*respiratory bronchiolitis*“, DIP = „*desquamative interstitial pneumonia*“, DAD = „*diffuse alveolar destruction*“, OP = „*organizing pneumonia*“



Klinik der idiopathischen interstitiellen Pneumonien				
Klinische Diagnose	IPF	DIP	RB-ILD	AIP
Pathologisches Muster	UIP	DIP	RB-ILD	DAD
Nikotin von Bedeutung	Ja	Ja	<b>Ja</b>	Nein
Mittleres Alter (Jahre)	60	40	35	50
Beginn	Schleichend	Schleichend	Schleichend	Akut
Durchschnittliche Mortalität	70%	30%	0%	70%
Mittlere Überlebenszeit	3 Jahre	12 Jahre	Normal	2 Monate
Ansprechen auf Steroide	Gering	Gut	Gut	Gering
Komplette Remission möglich	Nein	Ja	Ja	Ja
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)				
Gesamtzellzahl	↑	↑	↑	↑
Neutrophile	↑	Unverändert bis ↑	Unverändert bis ↑	↑
Lymphozyten	Unverändert	Unverändert bis ↑		↑
Eosinophile	Unverändert bis ↑	Unverändert bis ↑		
Alveolarmakrophagen	↓	Unverändert gold/ gelbe Pigmentierung	Unverändert gold/ gelbe Pigmentierung	↓
HRCT-Befunde				
Lokalisation	Peripher basal subpleural	Peripher basal	Diffus	Diffus
Retikuläre Zeichnung	Ja	Ja (Linien)	Nein	Nein
Noduläre Zeichnung	Nein	Nein	Zentrilobulär	Nein
Milchglastrübung	Kaum	Ja	Fleckförmig	Ja
Konsolidierung	Nein	Nein	Nein	Ja
Traktionsbronchiektasen	Ja	Nein	Nein	Später

Klinik der idiopathischen interstitiellen Pneumonien				
Klinische Diagnose	NSIP	COP	LIP	Fibroelastose
Pathologisches Muster	NSIP	OP		
Nikotin von Bedeutung	Nein	Ja	Nein	Nein
Mittleres Alter (Jahre)	50	50-60	40-60	40-60
Beginn	Akut/Schleichend	Akut/subakut	schleichend	schleichend
Durchschnittliche Mortalität	>10%	<5%	30-50%	40-60%
Mittlere Überlebenszeit	bis 15 Jahre		11 Jahre	11 Jahre
Ansprechen auf Steroide	Gut	Gut	Gut	Gering
Komplette Remission möglich	Ja	Ja	möglich	
Bronchoalveoläre Lavage (BAL)				
Gesamtzellzahl		↑	↑	
Neutrophile	↑ (50%)	gemischt ↑		
Lymphozyten	↑ (50%)	gemischt ↑	↑	
Eosinophile	↑	gemischt ↑		
Alveolarmakrophagen	↓		↑	Nein
HRCT-Befunde				
Lokalisation	Peripher basal subpleural	bpleural,peribronchi eher basal	Diffus basal	Peripher
Retikuläre Zeichnung	Evtl.	Nein	Ja	Ja
Noduläre Zeichnung	Nein	15% d.Fälle	zentrilobulär	
Milchglastrübung	Ja	0% d.Fälle,Fleckförm	Ja	Kaum
Konsolidierung	Ja	0% d.Fälle,Fleckförm	Nein	Gering
Traktionsbronchiektasen	?	Nein	Nein	Später

**Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die Klinik der IIPs. Modifiziert nach [Travis, 2013].**

Ein retikuläres Zeichnungsmuster ist typisch für eine IPF, findet sich aber auch bei Kollagenosen und der Asbestose. Milchglasartige Zeichnungsmuster stehen vor allem bei der RB-ILD, DIP, EAA, COP/BOOP und NSIP im Vordergrund.

Zur weiteren Differenzierung der idiopathischen interstitiellen Pneumonien und artverwandter Erkrankungen kann die Durchführung einer bronchoalveoläre Lavage (BAL) und die Lungenbiopsie Sinn machen, vor allem wenn die bis dato erhobenen Befunde nicht eindeutig sind. Hier zeigen sich bei der IPF in der BAL eine eher leichte Neutrophilie und Eosinophilie. Eine ausgeprägte Lymphozytose spricht eher gegen eine IPF. Histologisch zeigen sich bei der IPF typische Fibroblastennester, sogenannte Fibroblasten-Foci, eine Bildung der typischen Honigwabemuster (engl. *honeycombing*) mit subpleuralem und septalem Verteilungsmuster und ein eher fleckförmiges Fibrosierungsmuster, das sogenannte „*usual interstitial pneumonia*“ oder UIP-Muster [Behr, 2013]. Ein solches UIP Muster in der Histologie findet sich aber auch bei bindegewebigen Systemerkrankungen (systemische Sklerose, Polymyositis), der chronischen EAA, infolge einer Asbestexposition, bei einer Lungenfibrose im Rahmen eines Hermansky-Pudlak Syndroms und der Amiodaron-induzierten Lungenfibrose.

Oftmals kann die sichere Diagnose nur als Ausschlussdiagnose und im mulitdisziplinären Rahmen (Klinik-Radiologie-Pathologie) gestellt werden [Behr, 2013].

## **1.2. Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)**

Die idiopathische pulmonale Fibrose ist nicht nur eine der häufigsten Formen der interstitiellen Lungenerkrankungen, sondern auch die mit der schlechtesten Prognose. Sie ist gekennzeichnet durch einen rasch-progredienten und therapierefraktären Verlauf, der meist innerhalb weniger Jahre zum Tod führt. Betroffen sind vor allem Menschen höheren Alters [Gribbin, 2006].

Wie der Name schon impliziert, ist die eigentliche Ursache dieser Fibroseform nicht (oder noch nicht hinreichend) bekannt.

### **1.2.1. Epidemiologie der idiopathischen pulmonalen Fibrose**

Selbst zur häufigsten Form der idiopathischen interstitiellen Pneumonie gibt es zur Inzidenz und Prävalenz wenig zuverlässige Daten, da groß angelegte Studien weitestgehend fehlen. Schätzungen der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung in Deutschland ergeben eine Häufigkeit von 2-29/100.000 [Ley, 2013]. Die meisten Studiendaten stammen aus Europa, Amerika und einige wenige aus Asien. Zusammenfassende Angaben sind hier sehr unterschiedlich und reichen bzgl. der Prävalenz von 0,7 bis 63/100.000 und bzgl. der Inzidenz von 0,6 bis 17,4/100.000 pro Jahr [Ley, 2013]. Die große Streuung lässt sich teilweise durch demographische und kulturelle Unterschiede erklären, also die Studienpopulation an sich, oder auch durch das Studiendesign. Der Einfluss dieser Faktoren ist jedoch noch unklar. Zudem spielen die in der Vergangenheit uneinheitlichen Definitionen der IPF (Diagnosekriterien, Falldefinition) eine Rolle. So liegt laut einer Metaanalyse aus 15 Studien die Prävalenz in den USA zwischen 14 und 27,9 Fällen/100.000 bei einer eng gefassten Definition und bei 42,7 und 63/100.000 bei einer weiter gefassten Definition. Die Inzidenz beträgt entsprechend 6,8-8,8/100.000 (enggefasste Definition) bzw. 16,3-17,4/100.000 (weitgefasste Definition) [Nalysnyk, 2012]. Inzidenz und Prävalenz steigen mit dem Alter an, sind etwas höher für Männer und haben in den vergangenen Jahren zugenommen.

Eine Schätzung einer Studie für Großbritannien ergab, dass die Inzidenz der IPF zwischen 1991 und 2003 um ca. 11% angestiegen ist [Gribbin, 2006].

Die geschlechterspezifische Verteilung wurde in einer Studie aus New Mexiko berücksichtigt, und ergab eine höhere Inzidenz bei Männern (10,7/100.00 pro Jahr) als bei Frauen (7,4/100.00 pro Jahr) [Coultras, 1994].

Oft diskutiert wurde in der Vergangenheit die Assoziation von Tabakrauchkonsum und der Entwicklung einer Lungenfibrose. Sie tritt jedoch nicht bevorzugt bei Rauchern auf. Das Risiko eines Rauchers eine Lungenfibrose zu entwickeln ist etwa 1,6-fach erhöht.

Die Mortalität der idiopathischen Lungenfibrose im 1-Jahres-Intervall wird etwas zwischen 6 % und 39 % angegeben, die 3-Jahres-Mortalität liegt je nach Studie zwischen 16 % und 77 % [Ley, 2012]. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten wird mit 2,5-5 Jahren nach Diagnosestellung angegeben [Panos, 1990].

Eine wichtige Rolle für die Prognose spielen darüber hinaus die Begleiterkrankungen. Hier sind vor allem die pulmonale Hypertonie und die mögliche Entwicklung eines Lungenkarzinoms zu nennen, die in etwa 4% bis 20 % der Patienten mit einer idiopathischen pulmonalen Fibrose betreffen kann [Ozawa, 2009].

### **1.2.2. Symptomatik und Verlauf der idiopathischen pulmonalen Fibrose**

Im Prinzip zeigen sich bei Patienten mit IPF zunächst Symptome wie bei den übrigen Lungengerüsterkrankungen auch. Initial tritt häufig eine chronische Belastungsdyspnoe auf, die im Verlauf zunehmend ist. Weiterhin beschrieben sind typische Symptome wie ein trockener Reizhusten, auskultatorisch zeigt sich ein basal betontes Knisterrasseln und es kommt zur Ausbildung von Trommelschlägelfingern und Uhrglasnägeln. Zudem liegt das Erkrankungsalter wie oben beschrieben um das 60. Lebensjahr. Vor dem 50. Lebensjahr tritt die Erkrankung nur selten auf. Charakteristisch ist auch ein fehlendes oder geringes Ansprechen auf Steroide oder Immunsuppressiva [Herold, 2012; Behr, 2013].

Zur Verlaufskontrolle der IPF eignet sich am besten die regelmäßige Messung der forcierten expiratorischen Vitalkapazität in der Lungenfunktionsprüfung. Schwankungen im Bereich um 5 % sind hier möglich, ein Abfall der Vitalkapazität um 5-10 % zeigt eine relevante Progression an. Ein Abfall über 10 % geht mit einem 4-8-fach erhöhten Risiko einher in den nächsten 12 Monaten zu versterben [Behr, 2013; Zappala, 2010; du Bois, 2011].

Mit Fortschreiten der Erkrankung kann es zur Ausbildung einer Zyanose kommen, die Dyspnoe kann sich bis hin zur Ruhedyspnoe verschlechtern und es kann zu Rechtsherzbelastungszeichen kommen.

Im Verlauf der Erkrankung spielen dann auch zunehmend Exazerbationen für den Patienten eine Rolle. Hierbei kommt es zu akut zunehmender Atemnot. Solche Exazerbationen können häufig auch letal enden [Collard, 2007].

### 1.2.3. Diagnose der idiopathischen pulmonalen Fibrose

Letztendlich handelt es sich bei der IPF um eine sogenannte Ausschlussdiagnose (siehe Abbildung 2, Seite 4). Es müssen also für die Diagnose einer IPF interstitielle Lungenerkrankungen mit einer bekannten Ursache ausgeschlossen werden.

Zunächst zeigen sich die oben genannten typischen Symptome, die bei vielen pulmonalen Erkrankungen auftreten.

In der klinischen Untersuchung fällt darüber hinaus oft eine auskultatorische Sklerophonie auf, auch als Knisterrasseln beschrieben. Diese ist primär in den basalen/basolateralen Lungenarealen lokalisiert [Bettencourt, 1994].

Bei Auftreten eines solchen Symptomkomplexes wird zunächst eine Basisdiagnostik mit einem Röntgen des Thorax und einer Lungenfunktionsmessung (Bodyplethysmographie, Spirometrie, Diffusionsprüfung) empfohlen. Die Lungenfunktionsprüfung kann auch gut als Verlaufsmarker verwendet werden.

Auch wenn standardmäßig häufig zunächst eine Röntgenaufnahme des Thorax angefertigt wird, spielt bei der Diagnosestellung letztlich das hochauflösende Thorax-CT (HRCT) eine wichtige Rolle. Hier stellt sich bei der IPF ein typisches „*usual interstitial pneumonia*“ oder UIP-Muster dar.

Ein typisches UIP-Muster muss dabei gewisse Kriterien erfüllen. Das Verteilungsmuster sollte subpleural und basal sein. Es zeigen sich retikuläre Veränderungen und das typische Bild einer honigwabenartigen Lungenstruktur (*honeycombing*) mit Bienenwabenzysten einer Größe von 0,3 bis maximal 2,5 cm. Das Vorliegen von Traktionsbronchiektasen belegt die Vernarbungsreaktion mit bindegewebigem Zug. Zudem dürfen keine Ausschlusskriterien vorliegen. Sind alle diese Kriterien erfüllt, liegt ein typisches UIP-Muster vor. Ein mögliches UIP-Muster liegt vor, wenn die Kriterien bis auf die honigwabenartigen Veränderungen des Lungengerüsts vorliegen [Behr, 2013].

Ausschlusskriterien eines UIP-Musters sind eine Dominanz der Veränderungen im Ober-/Mittelfeld sowie eine peribronchovaskuläre Betonung, extensive milchglasartige Veränderungen, profuse mikronoduläre Veränderungen, diskrete Zysten außerhalb der honigwabenartigen Areale, ein diffuses Mosaikmuster, welches bilateral oder in drei oder mehr Lappen vorliegt, sowie eine Konsolidierung in bronchopulmonalen Segmenten bzw. Lappen [Behr, 2013].

Findet sich nun ein oben beschriebenes sicheres UIP Muster im CT, und es finden sich keine konkurrierenden Ursachen der Fibrose, kann die Diagnose einer idiopathischen pulmonalen Fibrose gestellt werden. In Europa wird teilweise ergänzend eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, um eine chronische exogen allergische Alveolitis auszuschließen. Eine ausgeprägte Lymphozytose würde dabei primär gegen eine IPF sprechen [Ohshimo, 2009; Behr, 2013].

Zeigt sich kein sicheres UIP Muster, ist zur sicheren Diagnosestellung eine videoassistierte thorakoskopische Lungenbiopsie (VATS) zu empfehlen, wenn der Zustand des Patienten dies zulässt. Auch hier gibt es wieder das histopathologische UIP-Muster, das durch folgende Kriterien definiert ist (sicheres UIP-Muster): deutliche fibröse Veränderungen, ggf. Ausbildung der Honigwabenstruktur, inhomogene fleckförmige Verteilung der fibrotischen Veränderungen und Nachweis von Fibroblastennestern (Fibroblasten-Foci).

Beim Fehlen von fleckförmigem Befall oder Fehlen von Fibroblastennestern oder ausschließlicher Honigwabenbildung gilt das histopathologische UIP-Muster als wahrscheinlich. Bei Nachweis von lediglich fleckförmigem oder diffusem Fibrosebefall gilt das UIP-Muster als möglich. Bei diesen Einteilungen gilt immer, dass keine Kriterien vorliegen dürfen, die gegen ein UIP-Muster sprechen.

Ausschlusskriterien sind hier das Vorliegen von hyalinen Membranen, einer organisierten Pneumonie, Granulome, ein deutlicher interstitieller entzündlicher Prozess (nicht die Honigwaben betreffend), prädominante broncholozentrische Veränderungen oder andere histologische Funde, die eine alternative Diagnose wahrscheinlicher machen [Behr, 2013; Raghu, 2011].

Letztendlich sollte die Diagnose im multidisziplinären Rahmen gestellt werden, da sowohl die klinischen, radiologischen als auch pathologischen Befunde erst zusammenfassend die Diagnose absichern können.

#### **1.2.4. Pathomechanismen der idiopathischen pulmonalen Fibrose**

Die Pathomechanismen, die zu einer idiopathischen pulmonalen Fibrose führen, sind derzeit immer noch Gegenstand der Forschung, da sie noch nicht vollständig verstanden wurden.

Zunächst ging man davon aus, dass es sich um einen reinen Entzündungsprozess handelt, der zur Fibrosierung der Lunge führt. Ein Stimulus führt zu einer Alveolitis,

einhergehend mit einer Aktivierung des Immunsystems und einer Anreicherung von inflammatorischen Zellen im Bereich des Lungenparenchyms. Es wurde angenommen, dass diese chronische Entzündungsreaktion eine Störung der Alveolarstrukturen mit einem Funktionsverlust der Membranen zwischen Alveole und Kapillare verursacht [Crystal, 1981].

Diese Annahme begründete sich darin, dass es bei der IPF zu einer Erhöhung der Zellzahl mit einhergehender Verschiebung der relativen Anteile der Zelltypen zu einander kommt. Makrophagen stellen dabei die größte Gruppe dar. Zudem kommt es zur Persistenz von neutrophilen Granulozyten, also einer Alveolitis vom neutrophilen Typ. Zusammen mit B-Lymphozyten, die vermehrt vorkommen und aktivierten Makrophagen wurden sie für eine weitere Gewebeschädigung durch proinflammatorische Zytokine verantwortlich gemacht. Ein Nachstrom von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut sollte den Prozess unterhalten. Es wurde angenommen, dass der Nachstrom durch chemotaktische Faktoren aus Alveolarmakrophagen ausgelöst wurde [Crystal, 1981].

Auf diesen Annahmen basierte die lange Zeit durchgeführte antiinflammatorische und immunsuppressive Therapie mittels Kortison und/oder Azathioprin bzw. Cyclophosphamid, mit welcher Patienten behandelt wurden [American Thoracic Society, 2000]. Ein aus klinischer Erfahrung fehlendes Ansprechen der antiinflammatorischen/immunsuppressiven Therapie, negative Studienergebnisse [du Bois, 2011; Behr, 2011] und neue Erkenntnisse zur Pathogenese haben schließlich zu einem Paradigmenwechsel des pathogenetischen Konzepts der IPF geführt. Selman et al. stellten im Jahr 2001 die Hypothese auf, dass eine gestörte Interaktion zwischen Fibroblasten und Epithelzellen, ausgelöst durch Schädigung und nachfolgende Apoptose alveolärer Typ II Zellen (AECII), der Ausgangspunkt für die Erkrankungsentstehung ist [Selman, 2001]. Bereits 1998 machten Katzenstein und Myers die Beobachtung, dass es bei der IPF zu einer massiven Apoptose epithelialer Zellen kommt [Katzenstein, 1998]. Zudem wurde gezeigt, dass es auch zu fibrosierenden Prozessen der Lunge kommen kann, ohne dass Anteile aus dem Blut ins Gewebe übertreten [Adamson, 1988].

Aktuell werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die zu einer chronischen Gewebeschädigung im alveolären Epithel mit einer nachfolgenden AECII Apoptose

und letztlich zur Entstehung der IPF führen. Somit ist nicht ein einzelner schädigender Reiz auslösend, sondern erst der chronische Stimulus [Gross, 2001].

Untersuchungen bei familiären Formen der Lungenfibrose zeigten, dass Mutationen des Surfactantprotein C (SP-C) zu einer Fehlfaltung und intrazellulären Akkumulation führen, wodurch endoplasmatisches Retikulum (ER-) Stress ausgelöst wird, der, sofern er chronisch und maladaptiv verläuft, in einer AECII Apoptose mündet [Mulugeta, 2015]. Neben SP-C führen verschiedene weitere Mutationen ebenfalls zu ER-Stress, zu lysosomalem Stress oder Schädigung der DNA in Typ-II Zellen und sind ursächlich für das Entstehen einer Fibrose bei diesen familiären Formen. Hierzu zählen Mutationen des Surfactant Protein A (SP-A) [Maitra, 2010] und des Lipidtransporters ABCA3 [Brasch, 2006; Garmany, 2006]. Zudem treten bei familiären Formen auch Mutationen im Telomerasekomplex (*Telomerase Reverse Transkriptase*, TERT; und *Telomerase RNA component*, TERC) [Armanios, 2007; Newton, 2016] auf, die primär zu einem DNA-Schaden führen. Auch bei nicht-familiären, sporadischen Formen der IPF ist ER-Stress ein häufiges Phänomen und es wird vermutet, dass so eine chronische Zellschädigung, eine Apoptoseinduktion und letztlich eine Fibroseentwicklung begünstigt werden [Korfei, 2008; Lawson, 2008]. Die dem ER-Stress zugrundeliegende Ursache bei den sporadischen Formen ist jedoch nicht bekannt.

Bei der normalen Wundheilung folgt auf eine Gewebeverletzung eine zügige Reepithelialisierung in denudierten Basalmembranen.

Bei der Lungenfibrose ist dieser Prozess gestört bzw. verlangsamt, es kommt zu einem Untergang der Typ-I-Epithelzellen und der Endothelzellen [Hagimoto, 2002]. Dies geht einher mit einer Proliferation der Typ-II-Pneumozyten, die aber nicht in der Lage sind die entstandenen Gewebeverletzungen zu reparieren und letztlich in die Apoptose gehen. Durch den Verlust der Typ-II Pneumozyten und damit auch einer Kontrollfunktion über Fibroblasten, kommt es zur Ansammlung von Fibroblastennestern, der Proliferation und Transdifferenzierung in Myofibroblasten [Kuhn, 1989; Katzenstein, 1998], die in der Lage sind Extrazellulärmatrix (ECM) zu produzieren. Die übermäßige Ablagerung von ECM-Proteinen, insbesondere Kollagen I, III, IV, V, VI, Glykoproteine wie Fibronectin, Laminin und Proteoglykanen führt letztlich zu einem Verlust der Gasaustauschfläche und zu einer Vernarbung der Alveolarstruktur [Strieter, 2005; Attisano, 2002; Selman, 2001; Shetty, 1996].



Im Rahmen der Fibroseentwicklung kommt es zur Aktivierung zahlreicher zellulärer und humoraler Effektorsysteme, an denen verschiedene Signaltransduktionswege und Faktoren beteiligt sind. Neben dem Gerinnungs- und Fibrinolysesystem, dass später in einem gesonderten Kapitel behandelt wird, sind dies vor allem Wachstumsfaktoren, Integrine, Zytokine und Matrixmetalloproteinasen.

Die weiteren wichtigsten Systeme in einem kurzen Überblick:

Eine zentrale Rolle spielt der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Dieser wird über Integrine aktiviert und ist in der Lage die Genexpression profibrotischer Faktoren zu beeinflussen. TGF- $\beta$  kann die epitheliale Apoptose fördern, beeinflusst die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten und somit die Produktion von Extrazellulärmatrix [Kawabata, 1999; Eickelberg, 2001; Fehrenbach, 2001; Verrecchia, 2001].

Weitere wichtige Wachstumsfaktoren sind der „*Platelet Derived Growth Factor*“ (PDGF), welcher ebenfalls Stimuli zur Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten setzt, der „*Fibroblast Growth Factor*“ (FGF), der „*Vascular Endothelial Growth Factor*“ (VEGF), welcher eine Angiogenese anregt und der „*Connective Tissue Growth Factor*“ (CTGF), welcher ein Mediator für die Produktion von TGF- $\beta$  und Thrombin ist [Hernández-Rodríguez, 1995; Furstoss, 2002; Hoher, 2000; Borensztajn, 2013; Fehrenbach, 2001].

Die Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-4,-1 und -13 (IL-4, IL-1, IL-13), welche von T-Helferzellen ausgeschüttet werden, fördern ebenfalls die Migration und Proliferation von Fibroblasten und deren Differenzierung in Myofibroblasten [Pantelidis, 2001].

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind am Metabolismus der ECM beteiligt und werden von Fibroblasten, Alveolarepithel und inflammatorischen Zellen exprimiert. MMP 2 und 9 (Gelatinase A und B) sind in der Lage Kollagen IV zu spalten [Nagase; Woessner, 1999; Suga, 2000; Kaminski, 2000]. Allerdings sind bei der IPF neben den Gelatinasen auch ihre Inhibitoren, die „*Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases*“ (TIMP), in weit stärkerem Maße hochreguliert. Durch diese Hemmung der MMP-Aktivität wird mutmaßlich die Bildung von ECM und somit die Fibrosebildung begünstigt. Für zahlreiche MMPs (MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13) sind pro-fibrotische Effekte auch über andere Mechanismen beschrieben, z.B. indem

sie Wachstumsfaktoren und Chemokine aktivieren oder aus der ECM freisetzen [Günther, 1999b; Pardo, 2002].

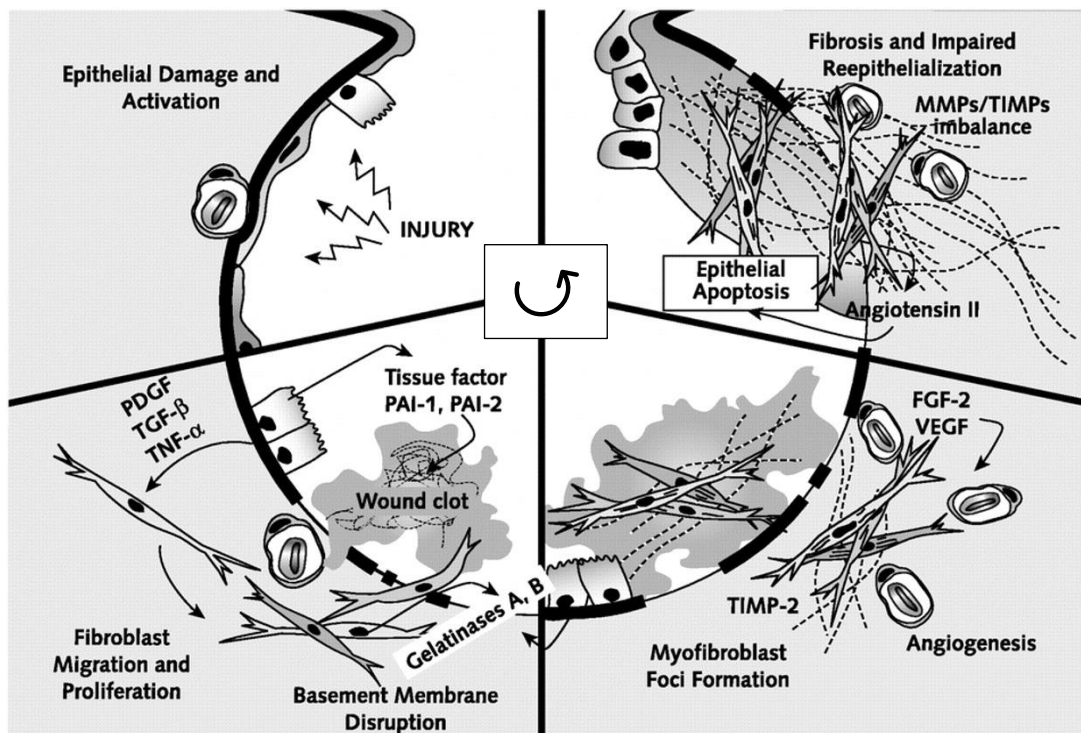


Abb. 3: Pathomechanistisches Konzept zur Entstehung der Lungenfibrose, nach [Selman, 2001]

Oben links: Multiple Microverletzungen führen zu einer Schädigung der Typ-II Pneumozyten und gleichzeitig zu deren Aktivierung um einen Reparatursprozess einzuleiten.

Unten links: Aktivierte Alveolarepithelzellen bilden reaktiv ein prokoagulatorisches und antifibrinolytisches Milieu im Alveolarraum, das eine Gerinnungsbildung als primären Wundverschluss verstärkt und sezernieren Wachstumsfaktoren. Zudem induzieren sie die Migration und Proliferation von Fibroblasten und deren Differenzierung in Myofibroblasten.

Unten rechts: Subepitheliale Myofibroblasten und Alveolarepithelzellen exprimieren Gelatinase, die eine Zerstörung der Basalmembran verursacht und eine weitere Fibroblasten- bzw. Myofibroblastenmigration erlaubt.

Oben rechts: Es kommt zur Neovaskularisation. Fibroblasten und Myofibroblasten sezernieren Extrazellulärmatrixproteine, in erster Linie Kollagen. Ein Ungleichgewicht zwischen interstitieller Kollagenase (Matrixmetalloproteinasen, MMPs) und deren Inhibitoren (*tissue inhibitors of*

***metalloproteinases, TIMP*) führt zu einer fortlaufenden Einlagerung von Extrazellulärmatrix und Vernarbung der Alveolarstruktur.**

### **1.2.5. Therapie der idiopathischen pulmonalen Fibrose**

Bis vor einigen Jahren wurden Patienten mit IPF primär mit einer Tripletherapie aus Prednisolon, Azathioprin und N-Acetylcystein behandelt. Diese Behandlung entsprach den Richtlinien der amerikanischen und europäischen Gesellschaft für Lungenerkrankungen [American Thoracic Society, 2000] und basierte auf der Annahme eines Entzündungsprozesses als Ursache. Nachdem mehrere Studien veröffentlicht wurden, welche einen nachweislichen Nachteil dieser Therapieform aufzeigten [Raghu, 2012; du Bois, 2011], wurden die ATS/ERS Empfehlungen zur Therapie der IPF revidiert [Raghu, 2011]. In neueren Studien zeigte sich auch, dass die alleinige Verwendung von N-Acetylcystein ebenfalls keinen Vorteil bringt [Martinez, 2014].

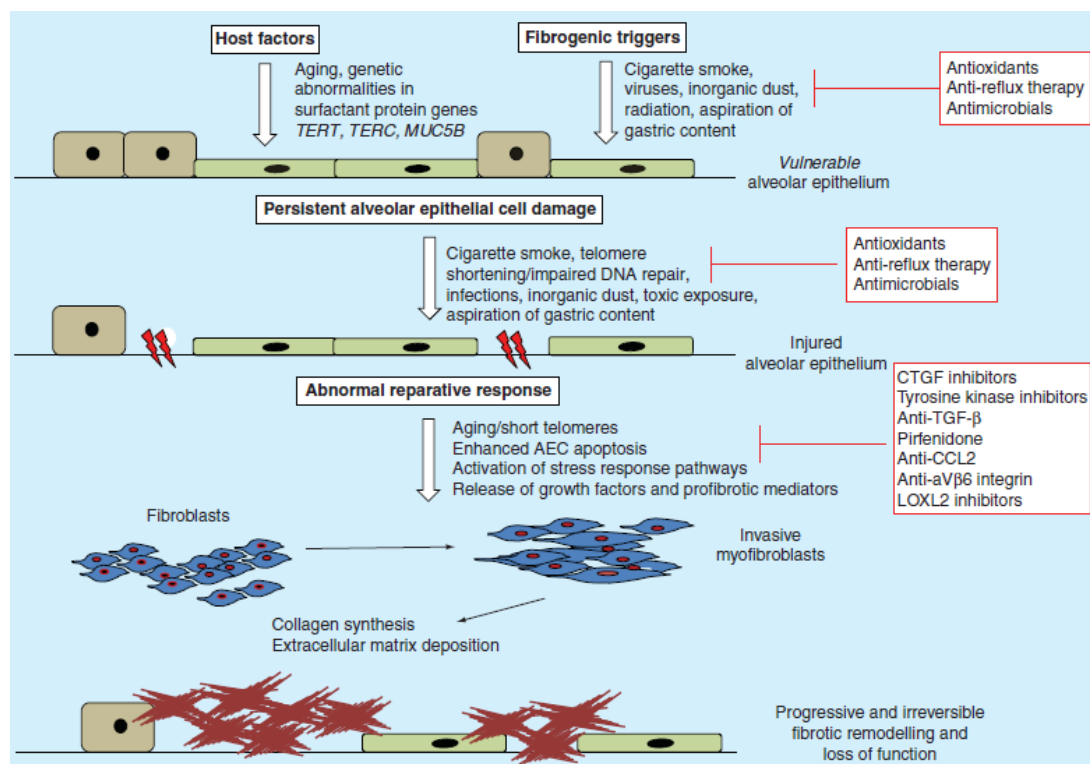
Aktuell stehen zwei Medikamente zur Behandlung einer Fibrose zur Verfügung: zugelassen bei milden bis moderaten Formen der IPF ist Pirfenidon, bei allen Formen zudem auch Nintedanib. Bei Pirfenidon handelt es sich um ein Pyridon-Derivat mit antifibrotischer Wirkung, dessen Wirkmechanismus noch nicht genau bekannt ist.

In einigen Studien wie u.a. der CAPACITY-Studie [Noble, 2011], der RECAP-Studie [Costabel, 2014] oder der ASCEND-Studie [Takeda, 2014] zeigte sich eine Überlegenheit und ein besseres Outcome der Patienten, die mit Pirfenidon behandelt wurden. Es zeigte sich ein positiver Therapieeffekt auf die Lungenfunktion und das progressionsfreie Überleben. Jedoch hat Pirfenidon auch einige bedeutsame Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Inappetenz und Leberwerterhöhung. Zudem kann es eine Photosensibilität auslösen.

Nintedanib ist ein Triple Tyrosinkinase Antagonist mit einer vorzugsweisen Hemmung von FGF, PDGF und VEGF. Hierdurch kommt es zu einer Hemmung der Fibroblastenaktivität und einer Verminderung des fibrotischen Umbaus. Dies wurde unter anderem in der TOMORROW-Studie und der INPULSIS-1 und 2 nachgewiesen. Als mögliche Nebenwirkungen treten gastrointestinale Beschwerden, Leberwertelelevationen und Blutungskomplikationen auf [Richeldi, 2011; Richeldi, 2014].

Weitere therapeutische Ansätze mit CTGF-Inhibitoren, Tyrosinkinaseinhibitoren, Anti-TGF- $\beta$ , Anti-CCL2, Anti- $\alpha$ V $\beta$ 6-Integrin Antagonisten oder LOXL2-Inhibitoren sollen die fehlgesteuerten Reparationsmechanismen, die zu einem fibrotischen Umbau führen, positiv beeinflussen und befinden sich aktuell in der klinischen Überprüfung [Spagnolo, 2014].

Letztendlich ist der einzig kurative Ansatz der IPF die Lungentransplantation [Raghu, 2012; Behr, 2013].



**Abb. 4: Pathogenetische Sequenzen der Fibroseentwicklung und mögliche Therapieansätze, aus [Spagnolo, 2014]**

### 1.3. Pulmonaler Surfactant

Das „*Surface Active Agent*“, im Allgemeinen mit dem Akronym „Surfactant“ beschrieben, spielt beim Gasaustausch eine zentrale Rolle. Dabei handelt es sich um ein Lipid-Protein Gemisch mit oberflächenaktiven Eigenschaften, dass nach Bildung und Speicherung in den Lamellarkörperchen der Typ-II-Pneumozyten in den Alveolarraum sezerniert wird. Dort lagern sich die Phospholipide und Surfactantproteine an der der Luft-Wasser-Grenzfläche an und senken die

Oberflächenspannung auf Werte von nahe 0 mN/m (zum Vergleich Wasser: 70 mN/m), ermöglichen so die Atmung bei niedrigen transthorakalen Drücken und verhindern einen Alveolarkollaps in der Endexpiration. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde Surfactant früher auch als Anti-Atelektasefaktor bezeichnet.

Der Zusammenhang zwischen Druck, Oberflächenspannung und Größe der Alveole kann durch die Young-Laplace-Gleichung beschrieben werden:  $p=2\gamma/r$  ( $p$ =Kollapsdruck,  $\gamma$ =Oberflächenspannung,  $r$ =Radius der Alveole). Der Druck wird also umso größer, je kleiner der Alveolenradius ist.

Bei der Expiration kommt es zu einer Verringerung des Alveolendurchmessers und damit zu einer Erhöhung des Druckes in den Alveolen. Um einen Alveolarkollaps zu vermeiden, ist daher eine Verminderung der Oberflächenspannung erforderlich [Wauer, 2004].

### **1.3.1. Zusammensetzung des Surfactants**

Surfactant setzt sich zu ca. 90% aus Lipiden und ca. 10% Proteinen zusammen. Innerhalb der Lipide dominieren Phospholipide mit einem hohen Anteil Phosphatidylcholin (ca. 80-85 %) und Phosphatidylglycerol (ca. 8-10 %). Andere Phospholipidklassen stellen Minorkomponenten dar, die zu 1-3 % vorkommen. Innerhalb der Fettsäurefraktion fällt ein hoher Gehalt an gesättigten Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure und Myristinsäure auf. Dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin (DPPC) ist die am häufigsten vorkommende Phospholipidspezies und macht 40 % aller Phospholipidmoleküle aus.

Der Proteinanteil besteht aus den hydrophilen Surfactantproteinen SP-A und SP-D sowie den hydrophoben Surfactantproteinen SP-B und SP-C. Mengenmäßig dominiert SP-A mit etwa 10 % und obwohl die kleinen hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C nur zu etwa 1-2 % in pulmonalem Surfactant vorhanden sind, sind sie ganz entscheidend für dessen Funktion [Andreeva, 2007; Wauer, 2004].

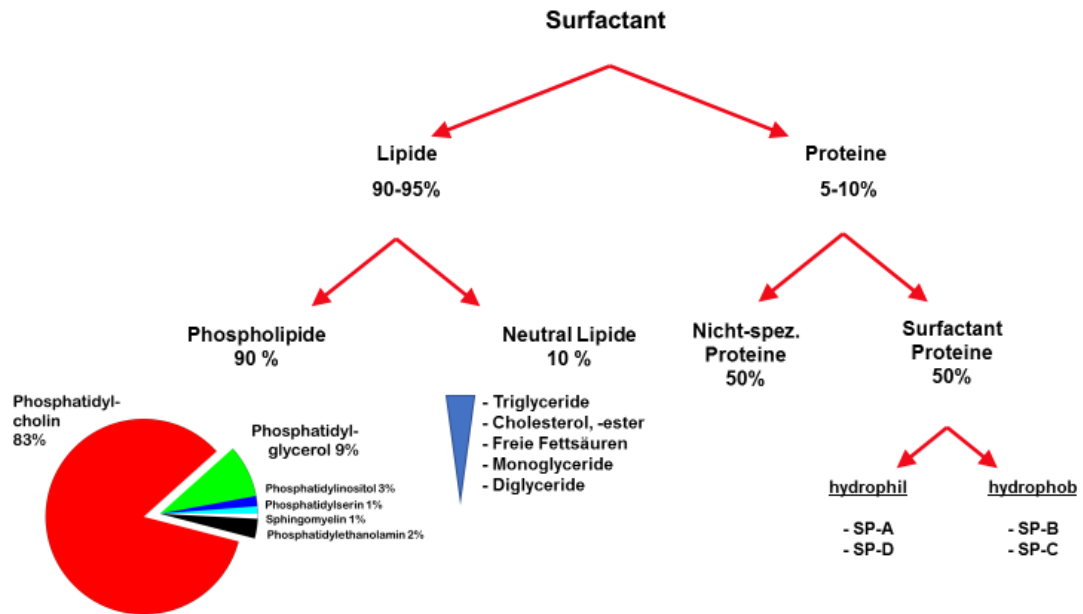


Abb. 5: Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants (zur Verfügung gestellt von C. Ruppert, modifiziert)

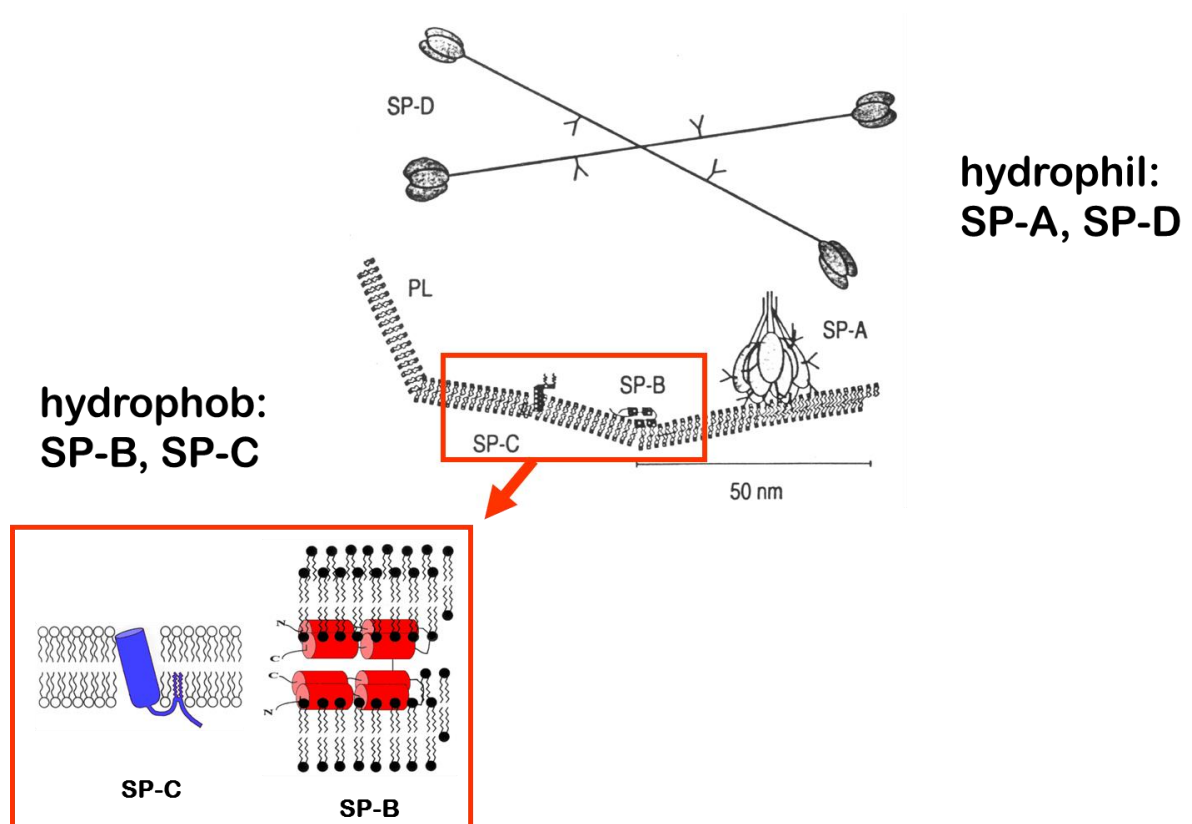


Abb. 6: Surfactantproteine, modifiziert nach [Griese, 1999; Johansson, 1997]

SP-A und SP-D gehören zur Gruppe der calciumabhängigen Lectine. Beide sind multimere Glykoproteine, die in ihrer funktionalen Form als Oktadecamer (aus 18 Monomereinheiten, SP-A) bzw. Dodecamer (aus 12 Monomereinheiten, SP-D) vorliegen. In ihrer Grundstruktur weisen sie eine kollagenartige Triplehelixregion und ein C-terminales homotrimeres Ende mit einer Lectin- oder Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne auf. Diese Domäne ist an der Erkennung von und Bindung an Oberflächenmarkern von Erregern beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr [Kishore, 2006; Han, 2015].

SP-C wird aus einem längeren Proprotein (ca. 25 kDa) durch proteolytische Spaltung gebildet, ist in seiner maturen Form nur ca. 5 kDa groß und besteht aus 35 Aminosäuren. Die Bildung erfolgt ausschließlich in Typ-II-Pneumozyten [Rooney, 1994].

Das zweite hydrophobe Surfactantprotein SP-B wird ebenfalls aus einer Vorstufe durch proteolytische Spaltung gebildet. Die SP-B-Vorstufe besteht aus 381 Aminosäuren und ist 42 kDa groß. Das mature SP-B ist noch ca. 8 kDa groß. In seiner funktionalen Form bildet es Homodimere, die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Gebildet wird das SP-B sowohl in Typ-II-Pneumozyten als auch in Clara-Zellen in der Lunge, in letzteren wird es aber nicht komplett bis zu seiner maturen Form prozessiert [Wauer, 2004; Pilot-Matias, 1989].

Das SP-B spielt für diese Arbeit eine übergeordnete Rolle, da es als Bestandteil des später näher beschriebenen SPUC-Hybridmoleküls verwendet wurde.

### **1.3.2. Funktion und Pathophysiologie des Surfactants**

Die Hauptaufgabe des Surfactants ist das Herabsetzen der Oberflächenspannung im Bereich der Alveolen. Über einen mehrschichtigen Film, der an der Luft-Wasser Grenzschicht dem Alveolarepithel aufliegt, ist Surfactant in der Lage, die Oberflächenspannung von 70 mN/m (für reines Wasser) auf Werte von nahe 0 mN/m zu reduzieren. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften können SP-B und SP-C sehr eng mit Phospholipiden interagieren und sind daher für die Oberflächenspannungsregulation essentiell, da sie während der Inspiration die Adsorption von Phospholipiden an die Luft-Wasser Grenzfläche erleichtern und den Phospholipidfilm während der Kompression stabilisieren. Dadurch wird der Kollaps

der Alveolen in der Endexpiration verhindert und der effektive Gasaustausch ermöglicht. Durch die Reduktion der Oberflächenspannung wird auch verhindert, dass sich ein Alveolarödem entwickelt (Anti-Ödemfaktor). Daneben fördert Surfactant die mucociliäre Clearance, erleichtert somit den Abtransport von Partikeln, und stellt einen mechanischen Schutz der alveolo-epithelialen Barriere dar [Dospil, 2005; Rooney, 1994].

Die Surfactant Proteine A und D spielen eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr der Lunge. Sie sind in der Lage mit Mikroorganismen und Immunzellen zu interagieren. Neben der direkten Interaktion und Aggregation mit Pathogenen sind SP-A und SP-D in der Lage, die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen zu steigern und chemotaktische Reize zu geben, sowie die Zytokinproduktion in Immunzellen zu stimulieren [Crouch, 2001; Vaandrager, 2000].

Es gibt eine Reihe von Erkrankungen, die mit einer Störung der Surfactantfunktion einhergehen. Einige wichtige werden im Folgenden erläutert.

Das „*Infant Respiratory Distress Syndrome*“ (IRDS) ist eine Erkrankung des Neugeborenen, bei der es aufgrund einer pulmonalen Unreife zu einem Atemnotsyndrom kommt. Dabei ist die Entwicklung und Differenzierung der Typ-II-Pneumozyten entwicklungsbedingt gestört, und das Surfactantsystem quantitativ vermindert und qualitativ verändert. Als Folge des Surfactantmangels entwickelt sich eine schwere Gasaustauschstörung. Eine Surfactantsubstitution führt zu einer signifikanten Verbesserung der Oxygenierung und pulmonalen Compliance und ist mittlerweile der Goldstandard in der Therapie des IRDS [Seeger, 2009; Sweet, 2007]. Ein vergleichbares Krankheitsbild, aber mit besonders dramatischem Verlauf zeigt sich bei einer erblichen Defizienz von SP-B, bzw. bei Mutationen im SP-B Gen, die zu einem funktionsuntüchtigen Protein führen. Diese enden meistens letal [Finer, 2004; Nogee, 1994].

Beim Mekoniumaspirationssyndrom, dem IRDS vom Krankheitsbild ähnlich, kommt es zu einer übermäßigen Inaktivierung von bereits gebildetem Surfactant durch Aspiration von Mekonium unter der Geburt. Die Pathophysiologie ist komplexer als beim IRDS und weist neben dem Funktionsverlust von Surfactant noch eine hohe Entzündungskomponente auf [Finer, 2004].

Im Verlauf des „*Acute Respiratory Distress Syndrome*“ (ARDS), dem akuten Atemnotsyndrom, kommt es zu einer dramatischen Gasaustauschstörung der



Funktionsstrecke der Lunge an dessen Pathophysiologie das Surfactantsystem entscheidend beteiligt ist [Günther, 2001]. Ausgelöst werden kann die Erkrankung durch eine Reihe unterschiedlichster Noxen wie einer direkten Schädigung der Lunge z.B. durch Einatmen toxischer Gase, Aspiration von Magensaft oder pulmonale Infektionen oder einer indirekten Schädigung im Rahmen einer Sepsis, Pankreatitis oder einem Polytrauma, die zu einem akuten Lungenversagen (die sogenannte „Schocklunge“) führen. Die genaue klinische Definition ist in den Berlin-Kriterien von 2012 nachzulesen [Ranieri, 2012].

Bei dieser Erkrankung kommt es durch die vielen unterschiedlichen Auslösefaktoren zu einer perpetuierenden Entzündungsreaktion auf alveolärer Ebene. Die kapilläre Gefäßpermeabilität steigt, es kommt zu einem Plasma-Protein-Influx in die Alveolen und es bildet sich ein Lungenödem. Die Kapillaren thrombosieren, die Alveolen kollabieren, und infolge der resultierenden Ventilations-Perfusions-Fehlverteilung kommt es zum intrapulmonalen Shuntfluss. Der Gasaustausch ist massiv gestört was sich in einer ausgeprägten arteriellen Hypoxämie widerspiegelt. Bei ARDS Patienten korrelieren die klinischen Parameter (z.B. Oxygenierungsindex) invers mit der alveolären Oberflächenspannung [Schmidt, 2007]. Der Verlust der Oberflächenspannungsregulation wird durch Veränderungen im Surfactantsystem hervorgerufen [Gunther, 1996; Günther, 1999a; Schmidt, 2001]. Der Phospholipidgehalt sinkt insgesamt zwar nur leicht, aber es kommt zu erheblichen Veränderungen im Phospholipid- und Fettsäureprofil. Der Anteil an Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin sinkt deutlich ab (um ca. 80%), insbesondere der Anteil des für die Oberflächenspannungsreduktion essentiellen dipalmitoylierten PC ist dramatisch verringert [Schmidt, 2001; Schmidt, 2007]. Die Surfactantbildung ist gestört, der Gehalt an den Surfactantproteinen SP-A, SP-B und SP-C ist deutlich reduziert [Greene, 1999]. Ausgenommen ist SP-D [Günther, 2001]. Es kommt zu einem Verlust der aktiven Surfactant-Subfraktionen mit Reduktion der sogenannten „*Large Surfactant Aggregates*“ (LSAs). Insbesondere das oberflächenaktive SP-B ist hierin vermindert [Günther, 2001; Günther, 1999a]. Durch die Schädigung der alveolo-epithelialen Barrierefunktion wird ein Übertritt von Plasmaproteinen, insbesondere Fibrinogen in den Alveolarraum begünstigt. Infolge einer Verschiebung der hämostaseologischen Balance zu Gunsten der prokoagulatorischen Faktoren kommt es zu einer Fibrinbildung und einer

einhergehenden Polymerisation und Ablagerung im Alveolarraum (sogenannter Hyaline Membranen) [Günther, 2001].

Qualitativ ähnliche Veränderungen der Surfactantkomposition mit einer Beeinträchtigung der oberflächensenkenden Funktion können auch bei interstitiellen Lungenerkrankungen beobachtet werden [Günther, 1999b; Schmidt, 2002; Honda, 1988; Hughes, 1989; Robinson, 1988; McCormack, 1991]. Bei der IPF sind die Surfactantveränderungen am stärksten ausgeprägt und die alveoläre Oberflächenspannung korreliert invers mit der FVC [Günther, 1999b]. Entsprechend konnte auch bei Patienten mit einer IPF ein erhöhter intrapulmonaler Shuntfluss als wesentliche V/Q Abnormalität dokumentiert werden [Günther, 2007].

Wie bereits oben erwähnt sind Mutationen im SP-C bzw. SP-A Gen die Ursache für familiäre Formen einer Lungenfibrose. Durch eine fehlerhafte Prozessierung der Proteine kommt es zur Fehlfaltung und Akkumulation in Typ II Zellen, wodurch proapoptotischer ER-Stress ausgelöst wird [Thomas, 2002; Bridges, 2003; Cameron, 2005].

Eine abnormale Surfactantprozessierung findet man auch bei pädiatrischen ILD-Patienten mit SP-B Mutationen [Griese, 2005] und ABCA3 Mutationen. Bei manchen SP-B Mutationen, die nicht zu einem letal verlaufenden neonatalen Atemnotsyndrom führen, können im Verlauf eine Zunahme von hyalinen Membranen, eine Verdickung der intraalveolären Septen und hyperplastische Veränderungen der Typ-II-Pneumozyten beobachtet werden. Oft gehen diese Veränderungen auch mit Veränderungen von SP-C einher [Vorbroke, 1995; Nogee, 1994; Nogee, 2000].

Der „ATP-Binding Cassette“ (ABC) Transporter A3 ist von großer Relevanz für die Lipidhomöostase von Zellen. Durch verschiedene Mutationen wird der intrazelluläre Phospholipidtransport und Surfactant-Metabolismus massiv gestört, was häufig innerhalb der ersten Lebensmonate zum Tode führt [Brasch, 2006; Garmany, 2006]. Es gibt aber auch chronische Verläufe, die sich als interstitielle Lungenerkrankungen manifestieren. Histologisch zeigen sich hyperplastische AEC-II Zellen, es kommt zu einer Zunahme der alveolären Wanddicke und zu einer Anreicherung von Proteinen und Makrophagen im Alveolarraum. Typisch für diese Erkrankung sind verkleinerte Lamellarkörperchen [Tryka, 2000].

Das Hermansky-Pudlack Syndrom ist eine autosomal-rezessive seltene Erkrankung die durch einen Albinismus und eine hämorrhagische Diathese gekennzeichnet ist [Hermansky, 2016]. Vor allem Patienten mit Genmutationen von HPS1 und HPS4

neigen zu einer Fibrosebildung die von einer IPF praktisch nicht zu unterscheiden ist [Nakatani, 2000]. Hier konnte gezeigt werden, dass der Fibroseentwicklung eine Störung der Surfactantbildung und des intrazellulären Transportes, mit Akkumulation von Proformen im ER und lysosomalen Kompartimenten und von maturem SP-B/C in Lamellarkörperchen zugrunde liegt die zur Auslösung von lysosomalem Stress, ER-Stress und AECII-Apoptose führen [Mahavadi, 2010]. Typisch für diese Erkrankung sind vergrößerte Lamellarkörperchen („*giant lamellar bodies*“) [Nakatani, 2000].

## **1.4. Das Gerinnungssystem und die Fibrinolyse**

### **1.4.1. Das Gerinnungssystem**

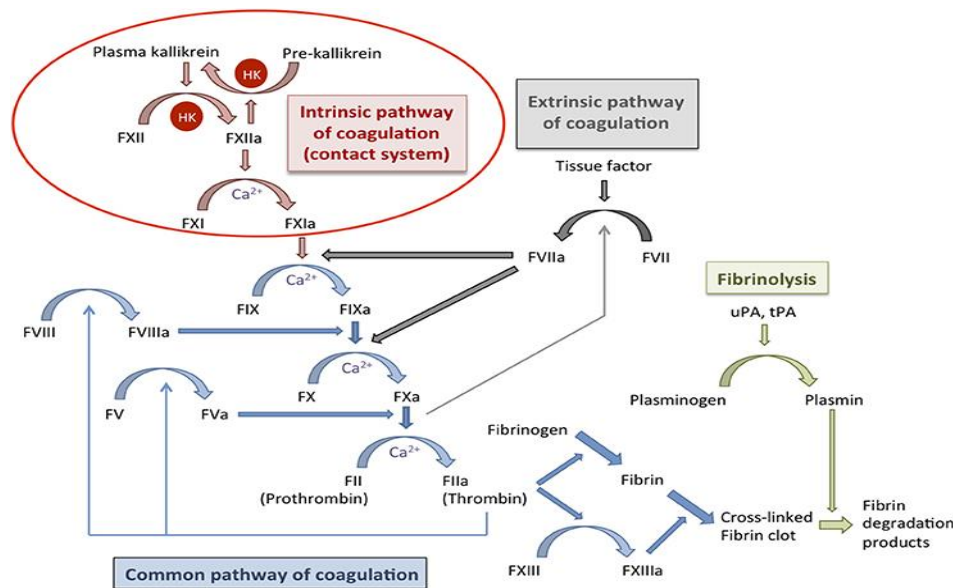
Das Gerinnungssystem des Menschen dient als Schutzmaßnahme des Körpers vor dem Verbluten. Nach einer Gewebsverletzung kommt es zu einer Vasokonstriktion, um die Blutzufuhr zu reduzieren. Neben der Aktivierung der Thrombozyten werden Gerinnungsfaktoren aktiviert und die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Hier greifen mehrere Faktoren (siehe Auflistung unten) ineinander, die über zwei alternative Wege aktiviert werden und in einer gemeinsamen Endstrecke Fibrinogen zu Fibrinmonomeren umwandeln. Hieraus entsteht ein Fibrinpolymer, das unter dem Einfluss von Faktor XIIIa quervernetzt wird und einen stabilen Wundverschluss bildet, der so zunächst auch vor einer vorzeitigen Thrombolyse geschützt ist [Renz-Polster, 2008].

Aktiviert wird die Gerinnungskaskade über zwei Wege: Der extrinsische Weg ist innerhalb von Sekunden aktiv. Über Gewebsverletzungen mit Einblutungen kommt es zur Freisetzung von Faktor III (*tissue factor*, Gewebsthromboplastin), welcher Faktor VII aktiviert, welcher wiederum mit Hilfe von Calcium Faktor X in seine aktive Form Faktor Xa umwandelt.

Der intrinsische Weg durch Endothelschädigung reagiert langsamer aber sensibler. Eine hierdurch hervorgerufene Aktivierung von Faktor XII (Hagemann Faktor) in Faktor XII a mündet wie beim extrinsischen Weg in der Aktivierung von Faktor X. Die Endstrecke ist von hier an für den intrinsischen Pfad und den extrinsischen Pfad die gleiche und führt zur Aktivierung von Thrombin, welches für die Fibrinogenspaltung verantwortlich ist [Renz-Polster, 2008].

Faktor I	Fibrinogen (Fibrinvorstufe, Synthese in der Leber)
Faktor II	Prothrombin ( $\alpha$ 1-Globulin, Proenzym des Thrombins, Synthese abhängig von Vitamin K in der Leber)
Faktor III	Gewebsthromboplastin, <i>tissue factor</i> (TF) (Phospholipoprotein, Startpunkt des exogenen Gerinnungssystems, Synthese in Gewebezellen)
Faktor IV	Calcium (notwendig bei Aktivierung der meisten Gerinnungsfaktoren)
Faktor V	Proakzelerin (lösliches $\beta$ -Globulin, Thrombozytenmembranbindend, aktiviert durch F IIa und $\text{Ca}^{2++}$ , Synthese in der Leber)
Faktor VI	aktivierter Faktor V
Faktor VII	Prokonvertin ( $\alpha$ -Globulin, Protease, F VIIa + F III + $\text{Ca}^{2++}$ aktivieren Faktor X im extrins. System, Synthese Vit. K abhängig in der Leber)
Faktor VIII	Komplex aus antihämophilen Globulin/ von-Willebrand-Faktor ( $\beta$ -Globulin, Kofaktor bei Umwandlung von F X in F Xa)
Faktor IX	Hämophilie-B-Faktor, Christmasfaktor ( $\alpha$ -Globulin, Protease, Mitaktivierung von Faktor X im intrinsischen System, Synthese Vit. K abhängig in der Leber)
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor ( $\alpha$ -Globulin, Protease, Bestandteil des Prothrombinaktivators, Synthese Vit. K abhängig in der Leber)
Faktor XI	Rosenthal-Faktor ( $\gamma$ -Globulin, Protease, F XIa + $\text{Ca}^{2++}$ aktivieren F IX)
Faktor XII	Hagemann-Faktor ( $\beta$ -Globulin, Protease)
Faktor XIII	Fibrinstabilisierender Faktor ( $\beta$ -Globulin, Transamidase, F XIIIa bewirkt Fibrinvernetzung, Synthese in Megakaryozyten)

**Tabelle 2: Übersicht der Gerinnungsfaktoren modifiziert nach [Renz-Polster, 2008; Schmidt, 2000]**



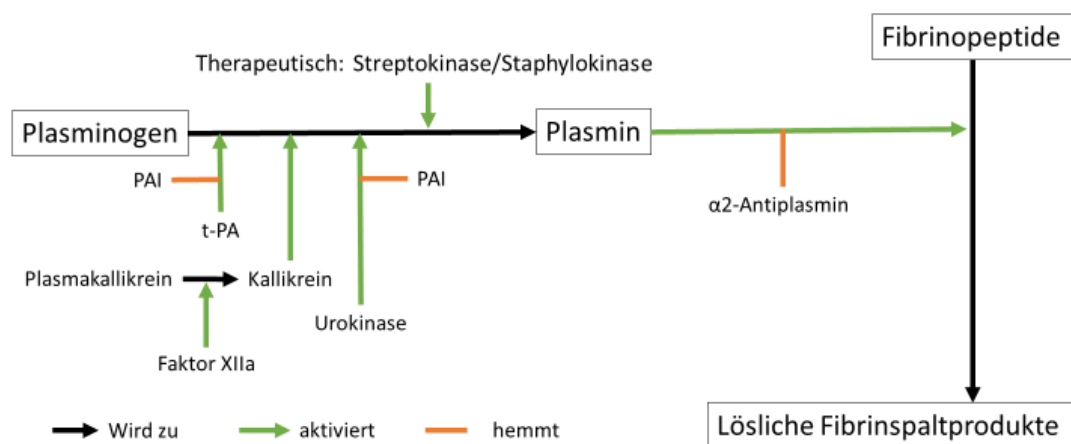
**Abb. 7: Schematische Übersicht über Gerinnungskaskade und Fibrinolyse.** Dargestellt sind intrinsischer Gerinnungspfad, extrinsischer Pfad, gemeinsame Endstrecke und die beteiligten Faktoren, die letztlich in der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin münden. Auf Seite der Fibrinolyse sind Urokinase (uPA) und Gewebepasminogenaktivator (tPA) durch die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin in der Lage ein Fibringerinnsel wieder aufzulösen. Aus [Loof, 2014]

#### 1.4.2. Fibrinolyse

Im intakten Organismus des Menschen bildet die Fibrinolyse als Gegenspieler zum Gerinnungssystem mit diesem ein Gleichgewicht. Die Fibrinolyse dient der Auflösung von Fibringerinnseln. Es findet permanent in gewissem Umfang eine Fibrinolyse statt, unter bestimmten Umständen, z.B. bei Verletzungen, wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Gerinnung verschoben. [Schmidt, 2000]

Die Fibrinolyse kann durch bestimmte Faktoren im Blut und Gewebe, sogenannte Plasminogenaktivatoren, aktiviert werden. Die Plasminogenaktivatoren spalten die intakte Vorstufe Plasminogen und generieren so die Serinprotease Plasmin. Plasmin, mit einer hohen Affinität zu Fibrin, ist in der Lage das quervernetzte Polymer zu spalten. Fibrinspaltprodukte sind zudem in der Lage die Thrombinwirkung zu hemmen und somit eine weitere Fibrinbildung zu hemmen [Renz-Polster, 2008; Schmidt, 2000].

Die Aktivierung der Fibrinolyse aus dem Blut heraus wird primär über den Faktor XIIa (Hageman Faktor) initiiert. Dieser benötigt Lysokinasen als Proaktivatoren wie Prokallikrein, welches bei Entzündungsprozessen freigesetzt wird [Schmidt, 2000]. Die Aktivierung aus dem Gewebe heraus erfolgt über den Gewebeplasminogenaktivator (t-PA, „*tissue type plasminogenactivator*“) oder Urokinase, die Plasminogen direkt in Plasmin umwandeln [Schmidt, 2000]. Urokinase und t-PA, sowie die bakteriellen Plasminogenaktivatoren Streptokinase und Staphylokinase, werden auch therapeutisch zur Thrombenauflösung genutzt. [Silbernagl, 2003]



**Abb. 8: Fibrinolyse: Umwandlung von Plasminogen in Plasmin und Regulationsmechanismen, modifiziert nach [Silbernagl, 2003]**

Um das Gleichgewicht zwischen Gerinnungssystem und Fibrinolyse zu steuern sind weitere Faktoren involviert.

Gerinnungshemmend wirken Antithrombin III (hemmt IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa, Kallikrein und Thrombin), Protein C (hemmt Faktor Va und VIIIa), α1-Antitrypsin (hemmt Faktor IIa und Plasmin), α2-Makroglobulin (hemmt Faktor IIa, Kallikrein und Plasmin) und C1-Inaktivator (hemmt Faktor XIa, XIIa und Kallikrein).

Fibrinolysehemmend wirken α2-Antiplasmin, welches Plasmin direkt hemmt, sowie der Plasminogenaktivator Inhibitor 1 (PAI-1), der der wichtigste Inhibitor der t-PA und uPA Aktivität ist [Schmidt, 2000].

### 1.4.3. Urokinase

Urokinase (oder auch uPA, *urokinase-type plasminogen activator*) ist ein Enzym, das zuerst im Urin nachgewiesen wurde, dort kommt es auch in hohen Konzentrationen vor. Es handelt sich um eine Serinprotease, die aus 411 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 50 kDa hat. Urokinase besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundene Polypeptidketten, einer (N-terminalen) A-Kette, an der sich eine Wachstumsfaktordomäne (Interaktion mit u-PAR) und eine Kringledomäne (Interaktion mit PAI-1, Heparinbindungsstelle) befinden und einer (C-terminalen) B-Kette, die die Serinproteinasen-Domäne (katalytische Einheit) enthält [Treiber, 2008; Stepanova, 2002]. Gebildet wird Urokinase in verschiedenen Geweben, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen und zirkuliert physiologischer Weise im Blutstrom [Tkachuk, 1996].

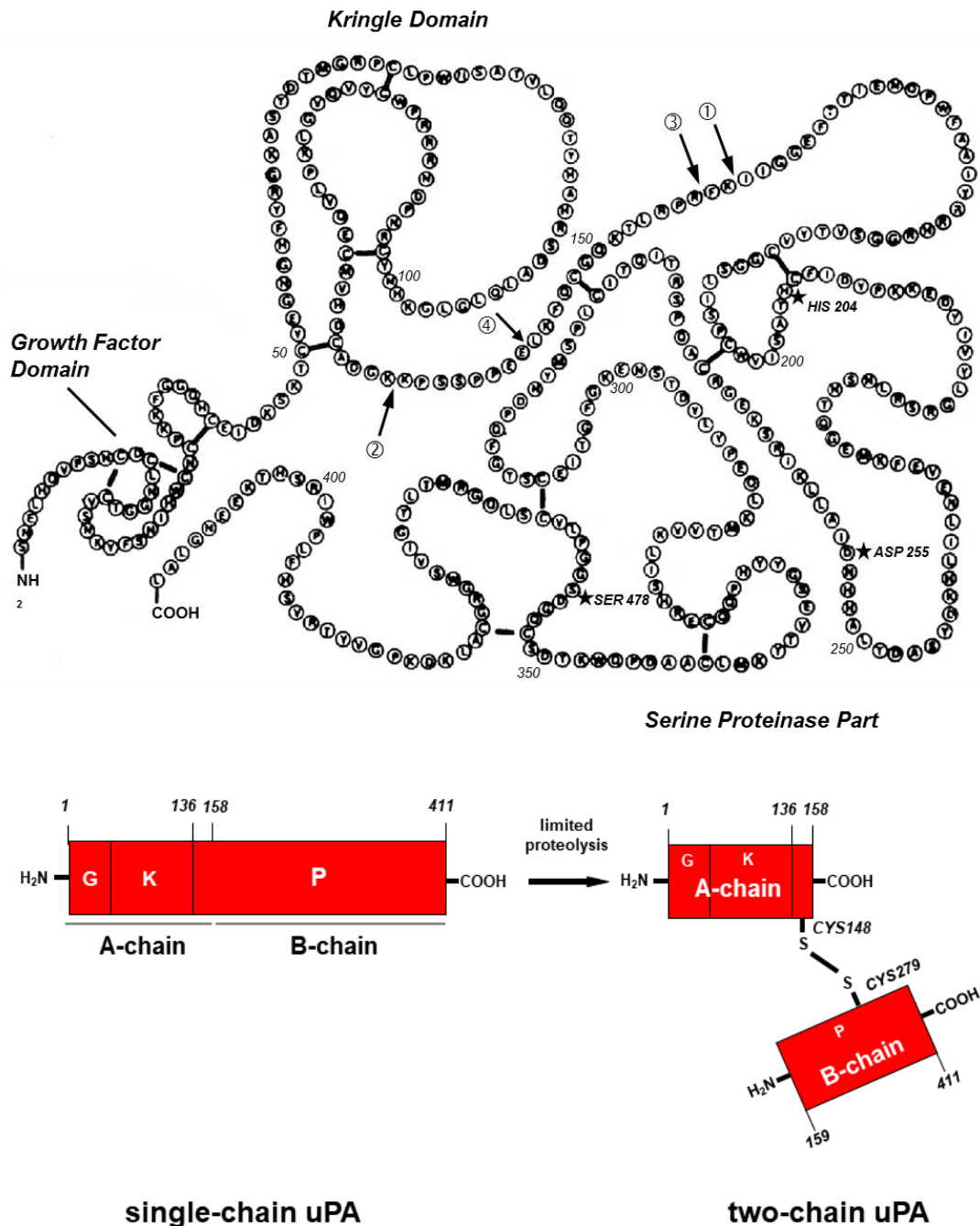


Abb. 9: Schematische Darstellung der Struktur und Domänen der Urokinase (oben) und Umwandlung der „single-chain“ Urokinase in „two-chain“-Urokinase (unten). Durch G= „growth factor like domain“, K= „kringle domain“, P= „protease domain“, ①-Aminosäure 158: Spaltstelle für Plasmin zur Generierung der *two-chain* uPA, ③-Aminosäure 136: Spaltstelle zur Generierung einer *low-molecular weight* uPA mit verkürzter A-Kette, His204/Asp255/Asp278: Aminosäuren des katalytischen Zentrums  
**B-chain:** Proteolytische Funktion [Stepanova, 2002]



Urokinase wird als einkettiges Protein synthetisiert (*single-chain uPA*, auch pro-u-PA), das keine bzw. kaum enzymatische Aktivität besitzt. Katalytische Mengen Plasmin, also das eigentliche Substrat, reichen aus um *single-chain uPA* zu spalten und in die aktive *two-chain* Form zu konvertieren. Auch Faktor XIIa und Kallikrein können das Zymogen aktivieren. Somit aktiviert das Vorhandensein von Plasmin in gewisser Weise seine eigene Bildung. Dies spielt vor allem extravasal eine Rolle. Bei der Aktivierung bindet pro-u-PA mit hoher Affinität an seinen spezifischen Rezeptor (u-PAR), welcher membrangebunden und gelöst vorliegen kann, und wird daraufhin durch Plasmin aktiviert [Ichinose, 1986; Pappot, 1995].

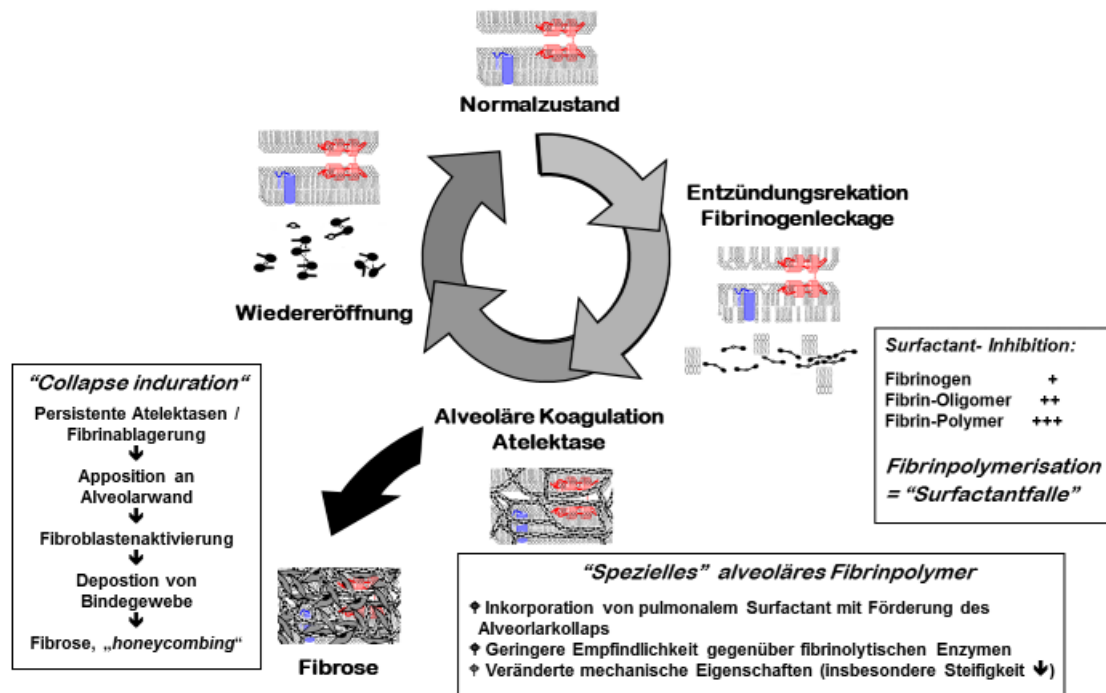
Urokinase ist ein Aktivator der Fibrinolyse. Es ist in der Lage Plasminogen in Plasmin umzuwandeln, wodurch Fibringerinnung durch proteolytische Spaltung wieder aufgelöst werden. Gegenspieler hier sind die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) [Loof, 2014]. Neben der Plasminaktivierung kann Urokinase auch über die Bindung an einen membranständigen Rezeptor u-PAR intrazelluläre Signaltransduktionswege induzieren. Hierdurch werden Funktionen wie Zelladhäsion und Zellmigration vermittelt. Der Rezeptor kommt an Endothelzellen, Epithelzellen, Leukozyten vor und wird auch häufig an Tumorzellen überexprimiert [Hildenbrand, 1998; Blasi, 2010].

### **1.5. Interaktion des Gerinnungssystems mit pulmonalem Surfactant und Rationale für ein Surfactant Protein B/Urokinase Fusionsprotein (SPUC)**

Für die Entstehung und den Verlauf der IPF spielt die überschießende alveoläre Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse-suppression eine möglicherweise wichtige Rolle. Anhand von Lavageuntersuchungen konnte beobachtet werden, dass es im Alveolarraum zu einer deutlichen Verschiebung der hämostaseologischen Balance zu Gunsten prokoagulatorischer und anti-fibrinolytischer Faktoren kommt [Idell, 1989], die eine alveoläre Fibrinbildung begünstigen [Imokawa, 1997]. Diese Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt über den extrinsischen Gerinnungspfad und wird hauptsächlich über Faktor III „*tissue factor*“ (TF) und Faktor VII vermittelt, die vermehrt durch AECII und Alveolarmakrophagen exprimiert werden [Günther, 2000; Kotani, 1995; Idell, 1991; Wygrecka, 2007; Wygrecka, 2004; Crooks, 2015].

Eine Reduktion des Urokinasegehaltes, der den wichtigen Plasminogenaktivator des alveolären Milieus darstellt, und ein Anstieg von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und  $\alpha$ 2-Antiplasmin führen zu einer verminderten fibrinolytischen Aktivität, wodurch gebildetes Fibrin nicht mehr entfernt und in der Alveole abgelagert wird [Günther, 2000; Idell, 1991]. Durch eine verminderte Protein-C-Aktivität wird die anti-fibrinolytische Aktivität unterstützt, da dessen antagonistische Aktivität auf PAI-I und die Gerinnungsfaktoren Faktor Va und Faktor XIIIa nicht mehr gegeben ist. Zudem geht so eine Hemmwirkung auf das Fibroblastenwachstum verloren [Wygrecka, 2008; Esmon, 2008].

Plasmaproteine wie Fibrinogen sind starke Inhibitoren der Oberflächenspannung senkenden Funktion von pulmonalem Surfactant. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Fibrinpolymerisation in Gegenwart von Surfactant hydrophobe Komponenten wie Phospholipide und insbesondere die beiden hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in ein sich bildendes Fibringerüst inkorporiert werden. Auf diese Weise kann die surfactantinhibitorischen Kapazität des Fibrinogens in erheblichem Maße gesteigert werden, da in Fibrin eingeschlossenes Surfactant der Oberflächenspannungsregulation entzogen wird und einen Alveolarkollaps begünstigt [Seeger, 1993; Markart, 2003; Günther, 1999b]. Surfactant beladene Fibringerinnsel weisen deutlich veränderte physiko-chemische Eigenschaften auf und zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber fibrinolytischen Ansätzen. Entsprechend dem Konzept der Kollapsinduration nach Burkhard [Burkhardt, 1989] sind es diese dauerhaft atelektatischen und Fibrin-verklebten Alveolarbezirke, die einen Nidus fibroproliferativer Prozesse darstellen. Komponenten der Gerinnung wie Thrombin fördern die Aktivierung und Migration von Fibroblasten, die letztlich für den Umbau des Lungengewebes verantwortlich sind [Burkhardt, 1989].



**Abb. 10: Pathophysiologisches Konzept der Interaktion von Gerinnung und Surfactant bei der Fibroseentstehung (zur Verfügung gestellt von C. Ruppert).**

Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass durch sequentielle Vernebelung von Fibrin und Thrombin ein Alveolarkollaps und eine Störung des Gasaustauschs durch die Induktion der alveolären Fibrinbildung provoziert werden kann [Schermyly, 2001]. Im Gegensatz dazu war eine Inhalation von Heparin (Verhinderung der Fibrinbildung) bzw. Urokinase (Lyse alveolären Fibrins) in der Lage die Entwicklung einer Lungenfibrose im Bleomycin-Modell am Kaninchen weitestgehend zu unterdrücken [Günther, 2003]. In anderen Studien mit Antikoagulantien oder Fibrinolytika konnten ähnliche Effekte gezeigt werden [Sisson, 2002].

Dabigatran als direkter Thrombininhibitor zeigte im bleomycininduzierten Fibrose-Mausmodell eine verminderte Kollagenanreicherung in der Lunge [Howell, 2001; Bogatkevich, 2011]. Ähnliche positive Effekte mit einer verminderten Thrombinproduktion konnten für Faktor-Xa-Inhibitoren wie Apixaban oder Rivaroxaban gezeigt werden [Scotton, 2009; Crooks, 2015].

Auch nach einer AECII-spezifischen Überexpression von Urokinase waren transgene Mäuse im Bleomycinmodell vor der Entwicklung einer Fibrose geschützt [Sisson, 2002].

Vor dem Hintergrund einer gesteigerten prokoagulatorischen und einer verminderten fibrinolytischen Aktivität bei der IPF, dem Verlust der Oberflächenaktivität und der

Inkorporation von Surfactantkomponenten in Fibrin wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiges Surfactant Protein B-Urokinase Fusionsprotein, genannt SPUC (*surfactant protein B urokinase conjugate*), entwickelt und durch chemische Kopplung bzw. rekombinante Expression in CHO Zellen hergestellt [Ruppert, 2003; Ruppert, 2008]. Durch die Kopplung von Urokinase an SP-B soll ein pulmonales Targeting (Beschränkung der fibrinolytischen Aktivität auf den Alveolarraum) und intra-pulmonales Targeting (präferentielle Verteilung innerhalb der Lunge an alveoläre, surfactantbeladene Fibringerinnsel) erreicht werden. Die in vitro Charakterisierung zeigte, dass dieses Protein im Vergleich zu nativer uPA eine verbesserte fibrinolytische Aktivität gegenüber alveolärem (Surfactant-haltigem) Fibrin und eine verbesserte PAI-1-Resistenz besitzt, sowie über die gleichen biophysikalischen Eigenschaften wie natives SP-B verfügt [Ruppert, 2003]. Transgene Mäuse, die dieses Fusionsprotein konditionell im alveolären Kompartiment überexprimieren sind vor einer Bleomycin-induzierten Lungenschädigung mit nachfolgender Fibrose weitgehend geschützt. Als mögliche protektive Mechanismen konnten eine verbesserte Oberflächenaktivität des Surfactants, die Entfernung von alveolär deponiertem Fibrin und ein erhöhter Schutz der alveolären Typ II Zellen vor Apoptose identifiziert werden (unveröffentlichte Daten aus unserer Forschungsgruppe).

## 2. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der gesteigerten alveolären Gerinnung, der supprimierten Fibrinolyse, der hieraus resultierenden alveolären Fibrinbildung mit Surfactantinkorporation, dem hiermit verbundenem Funktionsverlust pulmonalen Surfactants befasst sich diese Arbeit mit der Frage, ob die alveoläre-epitheliale Überexpression eines Fusionsproteins aus Surfactant Protein B und Urokinase, kurz SPUC, in der Lage ist, eine Fibroseentwicklung zu verhindern oder eine Progression zu verlangsamen. Hieraus sollte die Grundlage möglicher neuer Therapieoptionen geschaffen werden.

Hierzu wurden transgene Mäuse mit einer induzierbaren alveolär-epithelialen Überexpression von SPUC im Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose eingesetzt, und zwar zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Transgenaktivierung (durch Doxycyclingabe an Tag 0, 4 und 16).

Der Umfang der Fibroseentwicklung wurde mittels morphometrischer Auswertungen und biochemischer Analysen (Hydroxyprolinegehalt) ermittelt und es wurden weitere wichtige Daten wie das Gewicht der Tiere, die Überlebensrate sowie die pulmonale Compliance erfasst.

Im Detail wurden folgende Fragen untersucht:

- Kann durch die Typ-II Zell-spezifische Überexpression des SPUC-Fusionsproteins der Verlauf der Bleomycin-induzierten pulmonalen Fibrose beeinflusst werden?
- Gibt es Unterschiede im Verlauf der Fibrose oder in Bezug auf das Überleben der Tiere, wenn die Transgenaktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bleomycinschädigung stattfindet?
- Welcher therapeutisch günstigste Zeitpunkt ergibt sich daraus?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Bei den verwendeten Mäusen handelt es sich um transgene, SPUC-exprimierende Mäuse. Diese von unserer Forschungsgruppe generierten Tiere sind in der Lage ein Surfactant-Protein-B-Urokinase-Fusionsprotein (SPUC) induzierbar in alveolären Typ II Zellen herzustellen. Kreuzt man die Aktivatorlinie, die den reversen Tetrazyklin Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des humanen Surfactant Protein C-Promotors im respiratorischen Lungenepithel (SPC-rtTA-(tetO)7-CMV-SP-B) exprimiert und die Operatorlinie, die das Transgen unter Tetrazyklinoperatorkontrolle (tetO)7-CMV-SPUC beinhaltet, erhält man doppelt transgene Mäuse. In diesen bewirkt die Fütterung von doxycyclinhaltigem Futter die Bindung des reversen Tetrazyklin Transaktivators an den Tetrazyklin-Operator, was wiederum die Transkription des Transgens initiiert.

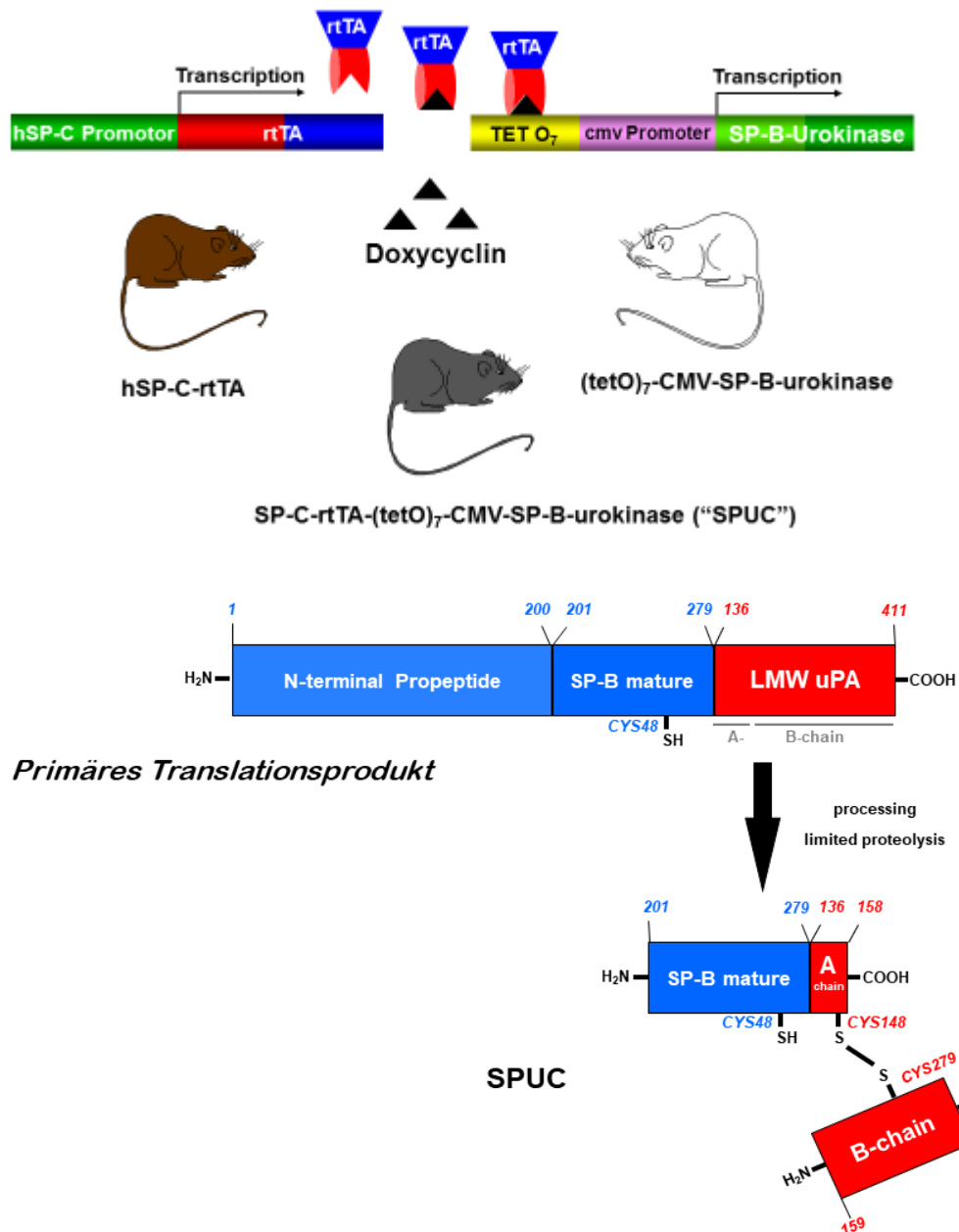


Abb. 11: Kreuzungsschema zur Generierung doppelt transgener SPUC Mäuse und Prozessierung des Translationsproduktes zum SPUC Protein. Die Mäuse kodieren für ein Fusionsprotein bei dem *low-molecular weight* (LMW) Urokinase an den C-Terminus von ProSPBΔC gekoppelt ist. ProSPBΔC ist eine Proform des SP-B, dem das C-terminale Propeptid fehlt. Es wird im respiratorischen Epithel wie das native Proprotein prozessiert. Durch Abspaltung des N-terminalen Propeptids entsteht das SPUC Protein mit einem N-terminalen maturen SP-B Anteil und einem C-terminalen Urokinase LMW Anteil. Durch proteolytische Abspaltung wird die LMW Urokinase gespalten und die enzymatisch aktive B-Kette freigesetzt. (zur Verfügung gestellt von C. Ruppert)

### 3.1.2. Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche wurden im Rahmen des Tierversuchsantrages VI63-19c20-15(1) GI 20/10 Nr. 08/2003 vom 06.03.2003 durchgeführt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die gewonnenen Proben untersucht und die erhobenen Daten ausgewertet.

### 3.1.3. Injektionslösungen und Substanzen

Ketaminhydrochlorid (100mg/ml) (Ketavet <sup>R</sup> )	Bela Pharm, Vechta
Physiologische Kochsalzlösung	Baxter S.A., München
Isofluran (Isofluran Baxter <sup>R</sup> )	Baxter S.A.,
Unterschleißheim	
Xylazinhydrochlorid (2%ige Injektionslösung)	Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf
Heparin, 25.000 Einheiten (Heparin-Natrium 25000 Ratiopharm <sup>R</sup> )	Ratiopharm GmbH
Bleomycin, 15000 Einheiten (Bleomycin HEXAL <sup>R</sup> )	HEXAL AG, Holzkirchen

### 3.1.4. Tierexperiment

Die Versuchstiere wurden für die Dauer der Versuche im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen gehalten.

Die Fütterung erfolgte mit Altromin Standardlaborfutter, mit und ohne Beimischung von Doxycyclin (625 ppm) ad libidum. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Umgebungstemperatur betrug im Mittel 25 °C, die Beleuchtungsdauer im Tierstall 12 Stunden pro Tag.

Doxycyclinhaltiges Mäusefutter (625 ppm)	Altromin Spezialfutter GmbH & Co.KG, Lage
--	--

Geräte/Instrumente:



Atembox nach Robertson  
Binokular (Intubation)  
Narkosebox  
Microsprayer Modell IA-1C

Präparationsbesteck

Zytospin-Filter  
Zytospin-Zentrifuge Cellspin II  
Minivent Beatmungsgerät

Verbrauchsmaterial:

Einbettkassetten  
Einmalhandschuhe Nitra-TEX<sup>R</sup>  
Einmalspritze, 1ml, 20 ml (Injekt<sup>R</sup>)  
Tubes 15 ml (Cellstar<sup>R</sup>)

Haushaltsbindfaden Nr.12  
Heidelberger Verlängerung

Kanüle, 26G1/2“ (BD Microlance<sup>R</sup>)  
Mulltupfer, pflaumengross  
Reaktionsgefäße, 1,5 ml

Venenverweilkanüle, 20G (Vasofix Safety<sup>R</sup>)

Chemikalien/Reagenzien:

Alkoholisches Hautdesinfektionsmittel  
mit Povidon-Iod (Braunoderm<sup>R</sup>)  
Formalin (Roti-Histofix 4,5%)  
PBS

Boehringer, Ingelheim  
Paralux  
Vet Equipe  
PennCentury, Inc.,  
Wyndmoor  
Martin Medizintechnik,  
Tuttlingen  
Tharmac, Waldsolms  
Tharmac, Waldsolms  
Hugo Sachs Elektronik,  
Havard

Sakura, Staufen  
Ansell, Tamworth  
Braun, Melsungen  
Greiner Bio One GmbH,  
Frickenhausen

M.Schilling GmbH,  
Gelnhausen- Hailer  
Beckton-Dickinson,  
Beese, Barbüttel  
Eppendorf, Wesseling  
Berzdorf  
Braun, Melsungen

Braun, Melsungen  
Roth, Karlsruhe  
PAA Laboratories GmbH,  
Pasching, Österreich

### 3.1.5. Histologie

#### Geräte:

Digitale Kamera (DC 300 F)	Leica Microsystems, Nussloch
Heizplatte	Leica Microsystems, Nussloch
Kühlplatte (EG 1150 C)	Leica Microsystems, Nussloch
Mirax-Scanner	Carl Zeiss, Göttingen
Paraffinausgießstation (EG 1140 H)	Leica Microsystems, Nussloch
Paraffinstreckbad (HI 1210)	Leica Microsystems, Nussloch
Rotationsmikrotom, vollautomatisch	Leica Microsystems, Nussloch
Stereomikroskop, Durchlicht (DMLA)	Leica Microsystems, Nussloch
Vakuumgewebefixationsautomat (TP 1050)	Leica Microsystems, Nussloch
Wasserbad	Leica Microsystems, Nussloch

#### Verbrauchsmaterial:

Deckgläser, 24x36 mm	R.Langenbrinck, Emmerdingen
Einbettkassetten mit Deckel	Leica Microsystems, Nussloch
Eindeckmedium, Xylol-löslich (Pertex <sup>R</sup> )	Medite GmbH, Burgdorf
Mikrotomklingen S35	Feather, Japan (über Produkte für die Medizin AG, Köln)

Objektträger (Super Frost Plus<sup>R</sup>)

R.Langenbrinck,  
Emmerdingen

Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus<sup>R</sup>)

R.Langenbrinck,  
Emmerdingen

#### Chemikalien/Reagenzien:

Aqua dest.

Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, pro analysi

Merck, Darmstadt

Eosin-y-alkoholisch

Thermo Scientific,  
Kalamazoo

Essigsäure (100%)

Merck, Darmstadt

Ethanol (70 %, 95 %, 99,6 %)

Fischer, Saarbrücken

Salzsäure (25%)

Merck, Darmstadt

Hämalaun, sauer nach Mayer

Waldeck, Münster

Hämatoxylin

Polysciences, Warrington

Lichtgrün SF

Waldeck, Münster

Natriumchlorid

Roth, Karlsruhe

Orange G

Waldeck, Münster

Ponceau de Xylidin

Waldeck, Münster

Roti-Histol

Roth, Karlsruhe

Xylol

Roth, Karlsruhe

#### Quantitative histologische Auswertung

Software Axiovision 4

Carl Zeiss, Göttingen

Software Panoramic Viewer

Carl Zeiss, Göttingen

Morphometrieauswertepugin für Axiovision (SeMeLuG)

Steinbeis Transferzentrum,  
Reutlingen

### 3.1.6. Hydroxyprolinanalyse

#### Verbrauchsmaterialien:

Keramikkugeln 1,4 mm/2,8 mm

Peqlab, Erlangen

Reagiergefäße, 1,5 ml

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Schraubdeckelgefäß 2 ml

Peqlab, Erlangen

Wägepapier (MN226) 9\*11,5 cm

Macherey Nagel, Düren

#### Chemikalien/Reagenzien:

Hydroxyprolin Assay

QuickZyme, Leiden

Enthält:

-Chloramin T in 1-Propanol

-Perchlorsäure/Isopropanollösung

- 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) in Dimethylsulfoxid (DMSO)

-Collagen Standart

Salzsäure (25%)

Merck, Darmstadt

#### Geräte:

Homogenisator (Precellys)

Peqlab, Erlangen

Pipetboy

Fischer-Scientific

Pipetten

Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf

Vortexer (REAX 2000)

Heidolph, Schwalbach

Waage (AB54)

Mettler-Toledo, Gießen

Zentrifuge

Heraeus GmbH, Hanau

### 3.1.7. Sonstiges

#### Geräte:

Pipetboy	Fischer-Scientific
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesselin-Berzdorf
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph, Schwalbach
Zentrifuge	Heraeus GmbH, Hanau

#### Verbrauchsmaterialien:

Pipettenspitzen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Plastikpipetten (10 ml, 50 ml)	Fisher Scientific, Schwerte

#### Chemikalien/Reagenzien:

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

#### Chemikalien/Reagenzien:

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethanol	Fischer, Saarbrücken
Glycin	Merck, Darmstadt
Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid, pro analysi	Roth, Karlsruhe

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Bleomycinapplikation**

Zunächst wurde bei den Mäusen eine Inhalationsnarkose eingeleitet.

Dazu wurde die Maus in eine geschlossene Narkosebox aus Plexiglas gesetzt und 3-4% Isofluran mit Sauerstoff eingeleitet. Nach Erlöschen des Umdrehreflexes wurde das Tier aus der Box genommen und die Narkosetiefe mittels Prüfung des Zwischenzehenreflexes kontrolliert.

Wurde die nötige Narkosetiefe erreicht, folgte die orotracheale Intubation. Hierzu wurde die Maus mit den Incisivii an einer kleinen Metallstange fixiert. Die Mandibula wurde mit einer Pinzette eröffnet um den Blick auf den Pharynx zu ermöglichen. Mittels Stereomikroskop und Schwanenhalsleuchte war es so möglich den Laryngopharynx der Maus einzusehen und die Kunststoffspitze einer Venenverweilkanüle (20G) in der Trachea zu platzieren. Zur Induktion der Lungenfibrose wurden den Mäusen 3,75 Units Bleomycin/kg KGW in steriler, 0,9% NaCl-Lösung intratracheal über einen Microsprayer als Aerosol verabreicht.

Nach der Applikation wurde die Maus bei Bedarf mit einem Mini-Vent (Frequenz 180/min, Tidalvolumen 200µl, PEEP 2cm) nachbeatmet. Die Mäuse standen anschließend so lange unter Beobachtung, bis sie wieder voll bei Bewusstsein waren.

### **3.2.2. Gewicht**

Die Mäuse wurden alle zwei Tage mit einer digitalen Waage gewogen und das Gewicht protokolliert. In die Auswertung eingeflossen ist das Gewicht der Mäuse an Tag 0, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28.

### **3.2.3. Compliancemesung und Probengewinnung**

Zur Narkoseeinleitung und Euthanasie der Maus am Versuchsende wurde ein Gemisch aus Ketanest und Rompun im Verhältnis 1:1 verwendet. Hiervon wurden der Maus gewichtsadaptiert eine Überdosis injiziert. Nach Sicherstellung des Todes

der Maus, wurde sie mit Braunol auf der Ventralseite desinfiziert und so Verunreinigungen durch das Fell vermindert.

Die Trachea wurde mittels Schere und stumpfer Präparation dargestellt. Im kranialen Anteil wurde die Trachea mit einem Haushaltsfaden umschlungen und kranial davon eine kleine Inzision zwischen zwei Knorpelspangen gesetzt. In diese Inzision wurde ein Tubus (20G) eingebracht, mit dem Faden fixiert und die Maus zur Compliancemessung für 5 Minuten in die auf 37 ° C vorgewärmte Robertsonbox verbracht. Unter Beatmung mit einem vorgegebenen Volumen von 200 µl wurde der dafür benötigte Druck registriert und die Compliance berechnet. Die erhobenen Compliancedaten in ml/kPa wurden auf das Gewicht des Tieres bezogen und sind dieser Arbeit in ml/kPa/kg KGW angegeben.

Für die nachfolgende Probenentnahme wurde die Maus auf einer Unterlage fixiert und zunächst das Abdomen mit einem medianen Schnitt eröffnet.

Nach zwei entlang der untersten Rippenbögen gesetzten Entlastungsschnitte und erfolgter Zwerchfelldarstellung, konnte dies stichinzisiert und so ein Lungenkollaps herbeigeführt werden. Das Zwerchfell wurde anschließend mittels Irisschere vom medialen Thoraxansatz abgetrennt. Mithilfe einer Schere wurde eine vollständige Sternotomie durchgeführt, der Thorax aufgespreizt und fixiert.

Nach dem Aufsuchen des linken Hauptbronchus wurde dieser mittels einer Klemme, unter Schonung des Lungengewebes, ligiert. In die intratracheale Inzision wurde der Kunststoffschlauch einer Venenverweilkanüle (20G) eingeführt und über diese eine Lavage mit 3 x 350 µl NaCl durchgeführt, wobei die Lösung jeweils dreimal mittels einer Spritze in die Bronchien der rechten Lunge eingespült und wieder entzogen werden. Die Lavage wurde anschließend in ein Eppendorf-Cup gefüllt und auf Eis gelagert.

Nach der Lavage wurde die Klemme des linken Hauptbronchus entfernt und der rechte Hauptbronchus ligiert. Anschließend wurde dieser distal der Ligatur mittels Pinzette und Schere durchtrennt und die rechte Lungen in ein Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Um das Lungengewebe für histologische Untersuchungen weitgehend blutleer zu bekommen, wurde die Lunge gespült. Dies erfolgte durch eine Inzision in den linken Ventrikel und das Einführen einer Kanüle in den rechten Ventrikel mit

anschließendem Spülen von ca. 20 ml NaCl erreicht. Die blutleere Lunge wurde anschließend mit Formalin, dass über die Trachealinzision mit 20 cm Wassersäulendruck in die Bronchien geleitet wurde, fixiert. Nach Entfaltung der Lunge wurde der Hauptbronchus durchtrennt und die Lunge wurde in ein Formalin gefülltes 15ml Tube gegeben.

Die entnommenen Proben für die Histologie wurden 12-24 Stunden im Formalin belassen und anschließend in Einbettkassetten überführt und in PBS gekühlt gelagert, bis sie entwässert werden konnten. Die entwässerten Proben wurden dann in Paraffin gegossen und zur histologischen Weiterverarbeitung genutzt.

Die bronchoalveoläre Lavage aus der rechten Lunge, wurde bei 4 °C für 10 Minuten bei 300 RZB zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Zell-Pellet wurde mit 1 ml NaCl resuspendiert und davon aus 100 µl ein Cytospin bei 5 Minuten und 300 RZB angefertigt. Die angefertigten Cytospins trockneten anschließend bei Raumtemperatur.

Alle schockgefrorenen Proben wurden in einen -80 °C Gefrierschrank überführt.

#### **3.2.4. Histologie**

Für die histologische Aufarbeitung wurden die im Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten entwässerten und anschließend in Paraffin gegossenen linken Lungenflügel verwendet. Mit einem Mikrotom wurden jeweils 3 µm dünne Schnitte angefertigt.

Für die histologischen Standardfärbungen kamen folgende Protokolle zur Verwendung:



### **Färbeprotokoll Trichromfärbung „Goldner Masson“**

1. Schnitte entparaffinisieren

Xylol 10 Min.

2. Schnitte mit absteigender Alkoholreihe rehydratisieren

Ethanolspülung in folgender Reihe: 99,6%, 96%, 70%, Aqua dest

3. Eisenhämatoxylin nach Weigert 5 Min.

4. Spülen mit warmem Leitungswasser (3-4 Mal)

5. HCl-Alkohol (einmal schwenken)

(960ml Ethanol 96% + 40ml HCl 25%)

6. Warmes Leitungswasser 10 Min.

7. Ponceau de Xylidin 5 Min.

8. Spülen mit Essigsäure 1% (2-3 mal)

9. Orange G 20 Sek.

10. Spülen mit Essigsäure 1% (2-3 mal)

11. Lichtgrün 5 Min.

12. Spülen mit Essigsäure 1% (2-3 mal)

13. Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe

Ethanolspülung in folgender Reihe: 96%, 99,6%, 99,6%

14. Klären mit Xylol (3 Mal), Eindecken mit Pertex

### **Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung**

1. Schnitte entparaffinieren

Xylol 10 Min.

2. Schnitte mit absteigender Alkoholreihe rehydratisieren

Ethanolspülung in folgender Reihe: 99,6%, 96%, 70%, Aqua dest

3. Hämalun nach Meyer, sauer 20 Min.

4. Spülen mit Leitungswasser 5 Min.

5. Ethanol 96 % 1 Min.

6. Eosin-y-alkoholisch 4 Min.

7. Spülen mit Aqua dest

8. Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe

Ethanolspülung in folgender Reihe: 96%, 99,6%, 99,6%

9. Klären mit Xylol (3 Mal), eindecken mit Pertex

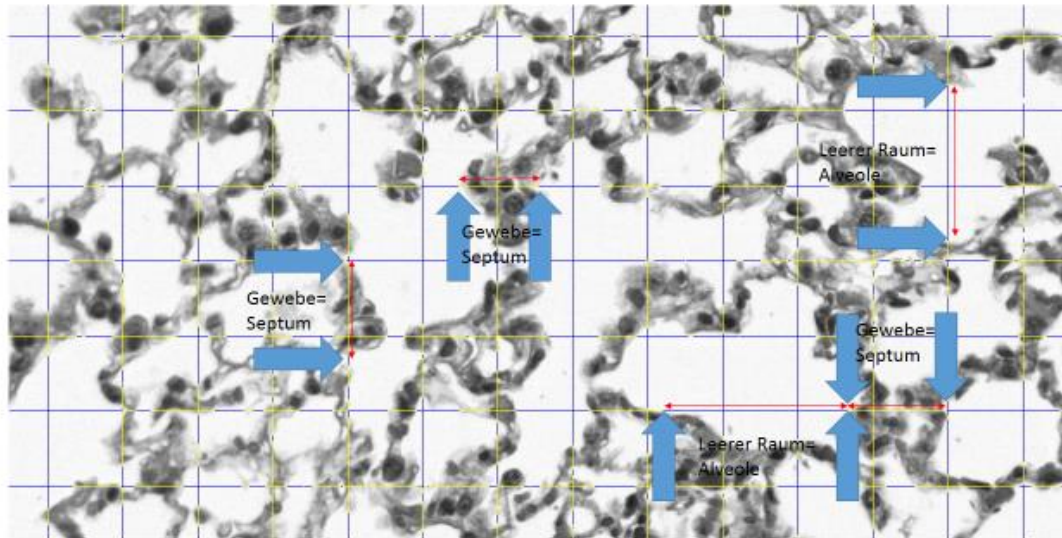
### 3.2.5. Quantitative histologische Auswertung

Die Hämatoxylin-Eosin- und Trichrom-gefärbten histologischen Schnittpräparate der linken Lunge wurden mit einem Mirax-Präparatescanner digitalisiert und abgespeichert.

Zur Quantifizierung der Fibrose wurde eine morphometrische Analyse an H&E gefärbten Schnitten mit Hilfe des Axiovision Auswertungsprogrammes SeMeLug durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden dazu die zu analysierenden Lungenareale mit Hilfe der Bildbetrachtungssoftware Panoramic-Viewer markiert und als tiff-Dateien exportiert. Auf diese Weise wurde ein Lungenschnitt in ca. 20-30 Lungenbereiche unterteilt, anschließend einzeln vermessen, und die Ergebnisse hinterher wieder zusammengeführt.

Das SeMeLug-Auswertemodul legte ein Raster aus horizontalen und vertikalen Messsehnern (chords) mit einem Abstand von 20 µm bei einer Skalierung von 1:1 mit 230 nm/Pixel auf die exportierten Einzelbereiche. Als Septendicke wurde die Länge einer Messsehne vom Auftreffen auf einen Gewebeabschnitt bis zu dessen Ende definiert, und als alveolärer linear intercept (Alveolengröße bzw. „Alveolendurchmesser“) wurde die Strecke des luftgefüllten Raums zwischen zwei Gewebeabschnitten definiert (Abb. 12).



**Abb. 12: Hier wird die bildmorphometrische Analyse eines histologischen Schnittes gezeigt. Ein Gitternetz aus horizontalen und vertikalen Messsehnern wurde auf das Schnittbild gelegt und die Längen der Gewebeabschnitte (gelbe Messsehnern) und der alveolären Anteile ohne Gewebe (=alveolar linear intercept bzw. „Alveolendurchmesser“, blaue Messsehnern) bestimmt.**

Jeder einzelne Septumabschnitt und jeder folgende Alveolarabschnitt wurde für alle exportierten Areale gemessen und in einer Exceltabelle zusammengetragen. Pro Lungenschnitt gingen so zwischen 20.000 und 60.000 Einzelmesswerte in die Analyse ein. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die mittlere Septendicken und der durchschnittliche Alveolardurchmesser („*mean alveolar linear intercept*“) errechnet, sowie die Dichten der Verteilungen von "Septendicke" und "alveolärer mean linear intercept" durch Kerndichteschätzung unter Verwendung des Programms „R“ ermittelt (Parzen-Fenster-Methode) Als Kernfunktion wurde die Dichte der Normalverteilung  $N(\mu, \sigma^2)$  verwendet, wobei  $\sigma$  die Bandbreite definiert [Parzen, 1962].

### 3.2.6. Hydroxyprolinanalyse

Für die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes der Lunge, als Marker für den bindegewebigen Umbau, wurde der QuickZyme Hydroxyproline Assay von QuickZyme Biosciences verwendet.

Für die Bestimmung wurde ca. 1/3 der rechten Lunge verwendet. Vor Beginn des Assays wurde das Gewicht der ganzen Lunge und das des eingesetzten Gewebestücks bestimmt. Das zu analysierende Stück Lungengewebe wurde in ein Precellys Homogenisator Röhrchen überführt und nach Zugabe von 1ml 6N HCl homogenisiert (2x 20 sec, 6300 rpm).

Die Homogenisate wurden im Anschluss für 24 Stunden bei 90 °C im Thermoblock verkocht und anschließend zur Kontrolle erneut gewogen.

Die Hydrolysate wurden dann bei 13.000 xg für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. 100 µl des Überstandes wurden im Verhältnis 1:2 mit 4N HCl verdünnt. Vom Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 300 µM, 200 µM, 150 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM und 12,5 µM Hydroxyprolin in 4N HCl hergestellt. Von den Standards und den hydrolysierten Lungenhomogenaten wurden jeweils 35 µl doppelt nach vorgegebenem Schema auf eine 96 well Microtiterplatte aufgetragen und 75 µl des Assay Puffers hinzugefügt. Die abgeklebte Platte wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert.

Vom Detektionsreagenz, aus 2 Teilen DMBA in DMSO und 3 Teilen 1-Propanol/Perchlorat, wurden weitere 75 µl in jedes Well gegeben und nach 60 Minuten Inkubation im Trockenschrank bei 60 °C wurde die Platte bei 570 nm im Photometer gemessen.

Anhand der mitgeführten Standardkurve wurden die jeweiligen Konzentrationen bestimmt. Die Hydroxyprolinkonzentration wurde am Ende dann auf das eingangs ermittelte Lungengewicht der gesamten Lunge bezogen und ist in µg Hydroxyprolin/Lungenflügel angegeben.

### 3.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Gruppen erfolgte mit Hilfe des Programms Graphpad Prism 5.0 unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests und des Log-Rank-Tests. Es wurden jeweils die Kontrollgruppe (SPUC-Maus ohne Transgenaktivierung) mit den SPUC-Mäusen mit Transgenaktivierung am Tag 0, Tag 4 und Tag 16 verglichen.

Als Signifikant wurde ein p-Wert von  $<0,05$  angenommen. Der Signifikanzgrad ist mit  $*(p<0,05)$ ,  $**(p<0,01)$  und  $*** (p<0,001)$  markiert.

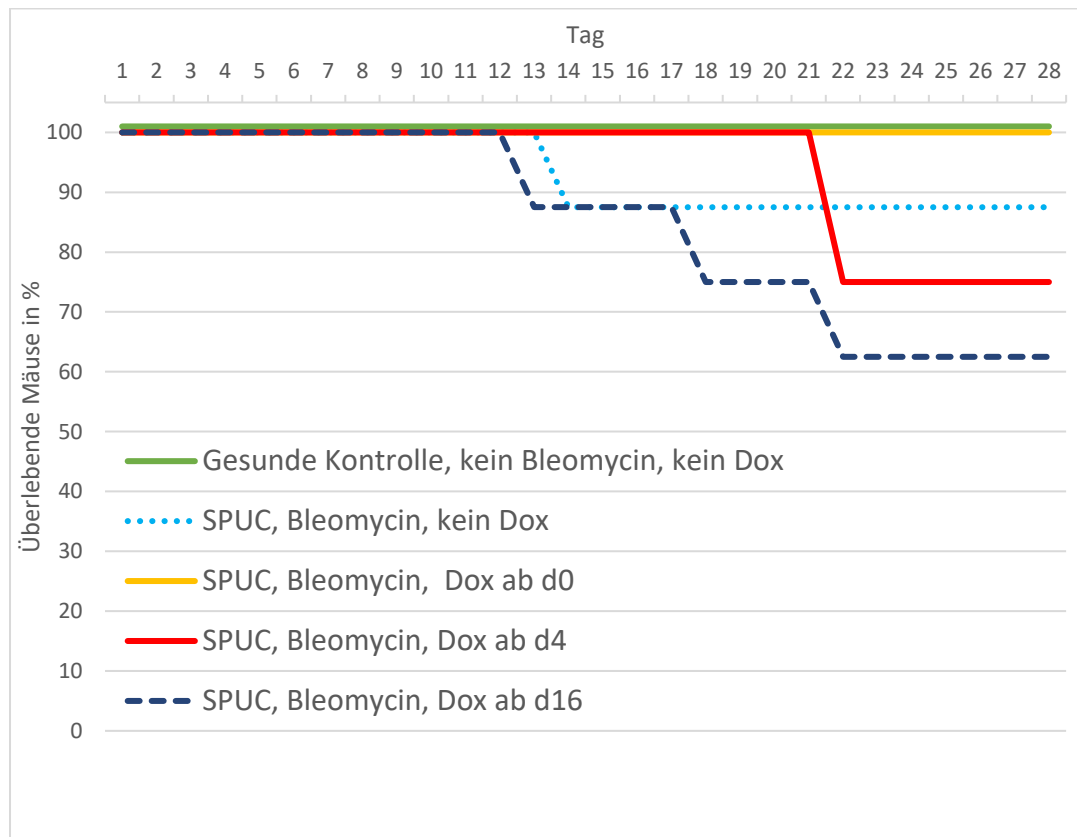
#### 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Zeitpunktes einer SPUC-Transgenaktivierung im Alveolarepithel auf die Entwicklung einer Lungenfibrose im Bleomycin-Modell der Maus untersucht.

Verglichen wurde die zeitgleiche Transgenaktivierung bei SPUC-Mäusen durch Zugabe von doxycyclinhaltigem Futter zu Versuchsbeginn ab Tag 0 (n=8 Tiere), zu einem frühen Zeitpunkt ab Tag 4 (n=8 Tiere) nach Fibroseinduktion und zu einem späten Zeitpunkt ab Tag 16 (n=8 Tiere). Das doxycyclinhaltige Futter wurde jeweils bis zum Ende des Versuchs an Tag 28 weiter verabreicht.

Als Referenztiere (n=8) wurden SPUC-Mäuse gewählt, bei denen ab Tag 0 durch Bleomycin eine Lungenfibrose induziert wurde aber kein Transgen aktiviert wurde. Zudem wurde eine gesunde Kontrollgruppe gewählt, denen kein Bleomycin appliziert wurde (n=8).

#### 4.1. Überlebensrate



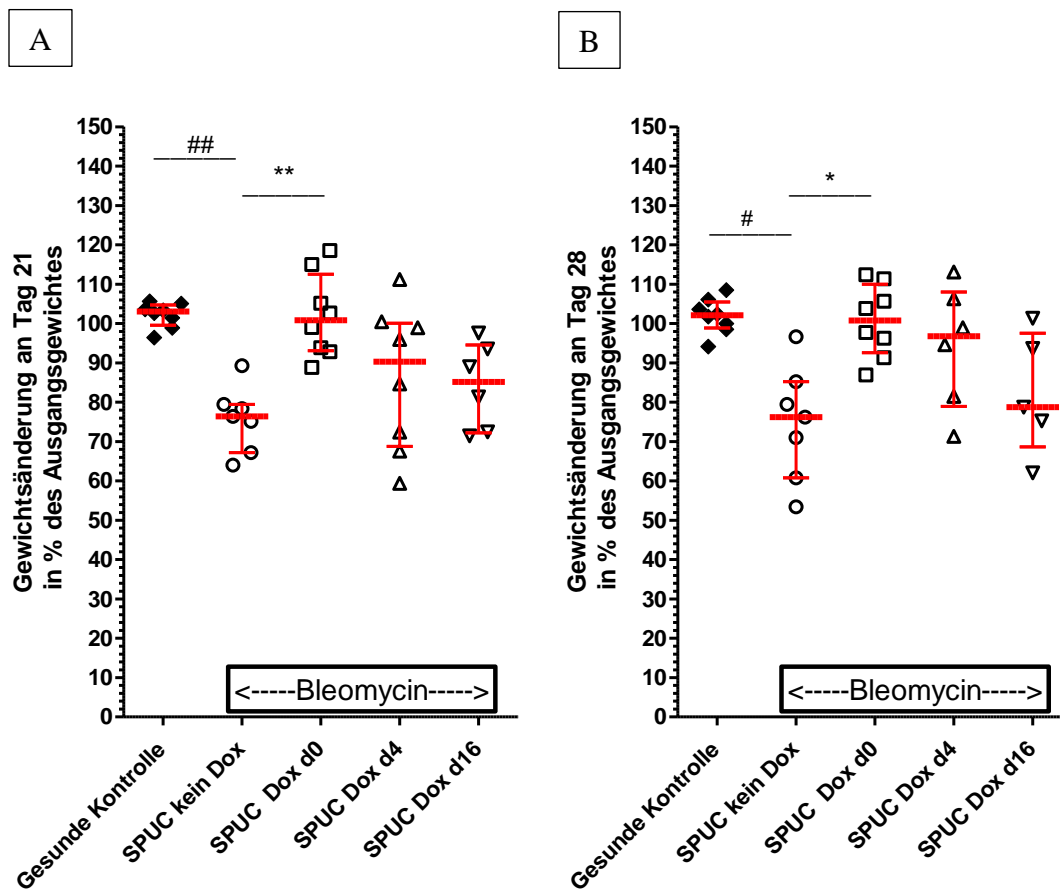
**Abb. 13: Überlebensrate der SPUC Mäuse im Bleomycinmodell dargestellt in %**

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in im Vergleich der Gruppen mit Transgenaktivierung durch Doxycyclin zu den Tieren ohne Transgenaktivierung festgestellt werden. Log-Rank-Test.

Bei der Überlebensrate zeigt sich bei der gesunden Kontrollgruppe und bei der Gruppe der bleomycingeschädigten Tiere mit Transgenaktivierung ab Tag 0 eine Überlebensrate von 100%. Hier erreichten 8 von 8 Tieren den Endpunkt an Tag 28. In der Referenzgruppe der SPUC Mäuse mit Bleomycinapplikation aber ohne Transgenaktivierung verstarb ein Tier (Überlebensrate 87,5 %), in der Gruppe mit SPUC-Mäusen und Transgenaktivierung ab Tag 4 starben zwei Tiere (Überlebensrate 75 %) und in der Gruppe mit Transgenaktivierung ab Tag 16 verstarben drei Tiere (Überlebensrate 62,5 %) vor Erreichen des Endpunktes an Tag 28. Signifikante Unterschiede im Vergleich der Tiere mit und ohne Transgenaktivierung waren im Log-Rank-Test nicht festzustellen

## 4.2. Gewicht

Zu Beginn und jeden zweiten Tag während des Versuchs wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt. Mit zunehmender gesundheitlicher Beeinträchtigung verloren die Tiere an Gewicht. Dies spiegelt in gewisser Weise das Fortschreiten des fibrotischen Prozesses wider. In Abbildung 14 ist das Gewicht an Tag 21 und Tag 28 bezogen auf das Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn dargestellt.



**Abb. 14: Gewichtsänderung der SPUC Mäuse im Bleomycin Modell.**

Dargestellt ist die Gewichtsänderung in % (bezogen auf das Gewicht zu Versuchsbeginn) der einzelnen Mäuse (den Gruppen entsprechend je Tier ◆○□△▽) an Tag 21 (A) und Tag 28 (B) nach Bleomycinapplikation bei SPUC Mäusen mit sofortiger □ (d0), früher △ (d4) und bei später ▽ (d16) Transgenaktivierung. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD. \* bzw. # ( $p < 0,05$ ), \*\* bzw. ## ( $p < 0,01$ ) Kruskal-Wallis-Test.



Bei den Bleomycin-behandelten Tieren zeigte die Referenzgruppe mit SPUC-Tieren ohne Transgenaktivierung den stärksten Gewichtsverlust (76% vom Ausgangsgewichts an Tag 21 und 28). Bei SPUC-Mäusen mit Transgenaktivierung war der Gewichtsverlust geringer ausgeprägt. Die SPUC-Mäuse mit Aktivierung des Transgens bei Versuchsbeginn (Tag 0) hatten dabei den größten positiven Effekt (101% vom Ausgangsgewicht an Tag 21 und 28); die Gewichtsänderung lag hier im Bereich der unbehandelten Kontrollen und war verglichen mit den Bleomycin behandelten SPUC-Tieren ohne Transgenexpression hochsignifikant an Tag 21 bzw. signifikant an Tag 28 verschieden.

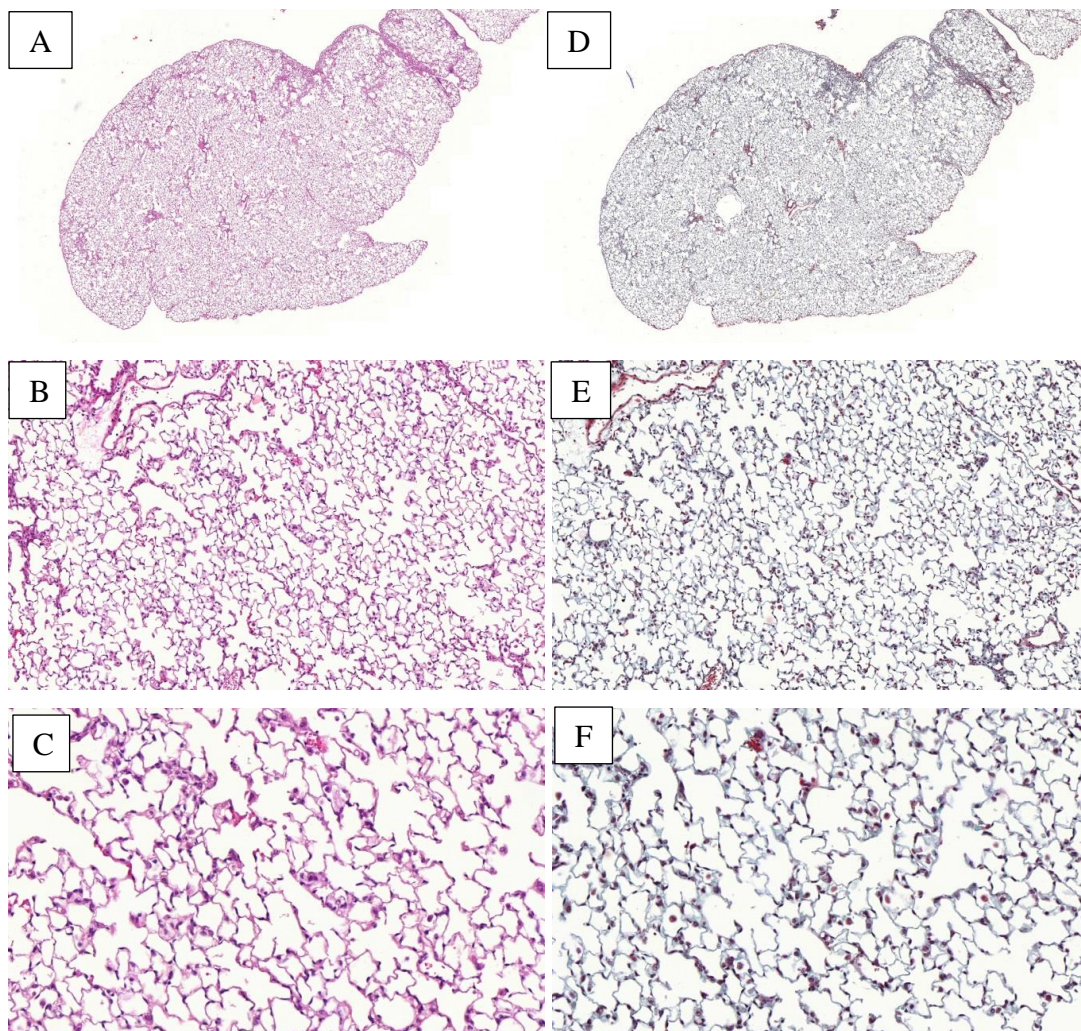
Je später die Aktivierung des Transgens erfolgte, desto weniger ausgeprägt war der positive Effekt. Bei den Tieren mit Transgenaktivierung ab Tag 4 betrug das Gewicht an Tag 28 97% des Ausgangsgewichtes und bei den Tieren mit Transgenaktivierung ab Tag 16 nur noch 78 % des Ausgangsgewichtes.

### 4.3. Histologie und bildanalytische Quantifizierung

#### 4.3.1. Histologische Beurteilung

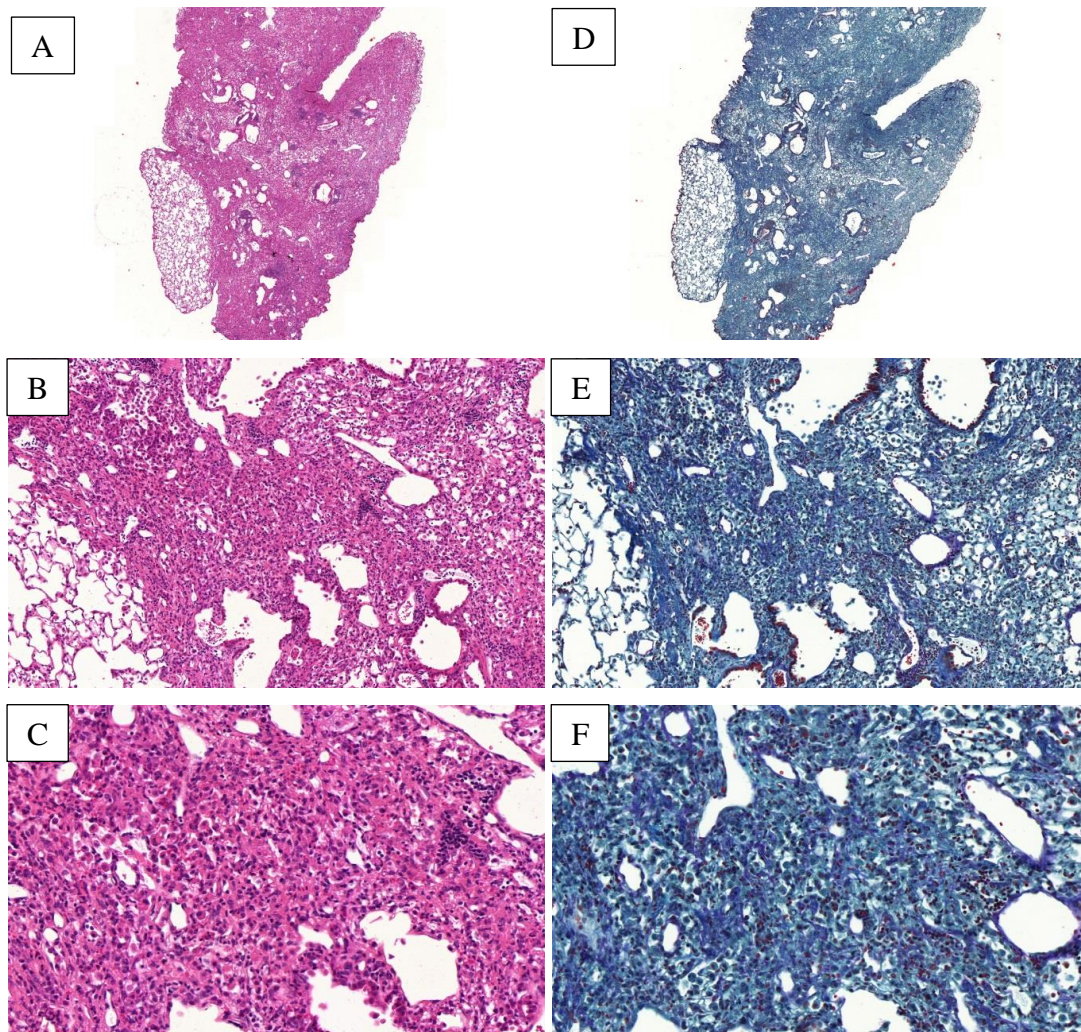
Nach Aufarbeitung der Lunge und Anfertigung von H&E bzw. Trichrom-gefärbten Schnittpräparaten wurden die Lungenabschnitte digital eingescannt und zunächst visuell überprüft.

Beispielhaft wird hier aus den verschiedenen Gruppen eine Lunge gezeigt: Jeweils ein Präparat in Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung, und ein Präparat in der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung in der besonders die Bindegewebsstrukturen zu sehen sind.



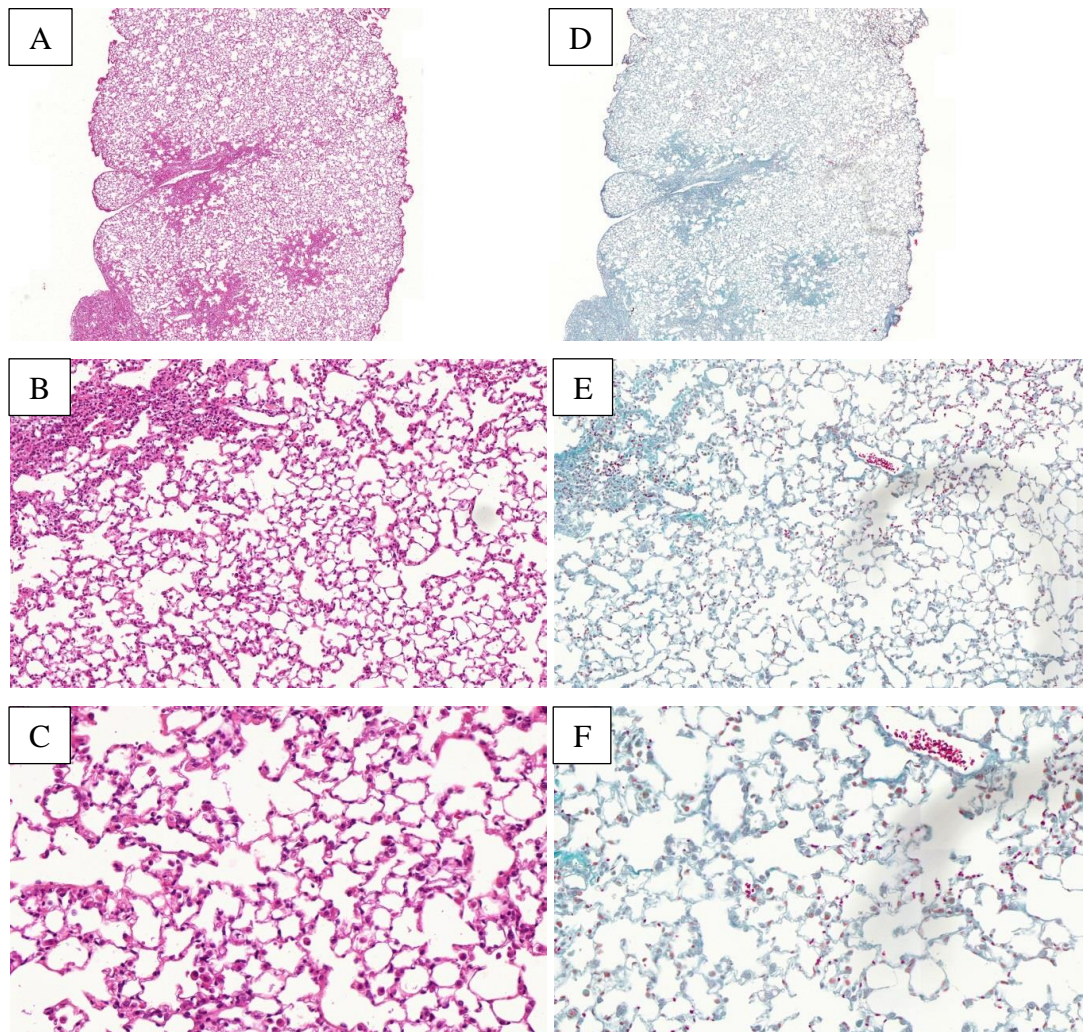
**Abb. 15: Lunge einer gesunden Maus aus der Kontrollgruppe ohne Bleomycinexposition.** Es zeigen sich keine fibrotische Veränderungen des Lungengerüsts. Links HE-Färbung (A-C), rechts Masson-Goldner-Färbung (D-F) jeweils 2-fach (A+D), 10-fach (B+E) und 20-fach (C+F) vergrößert.





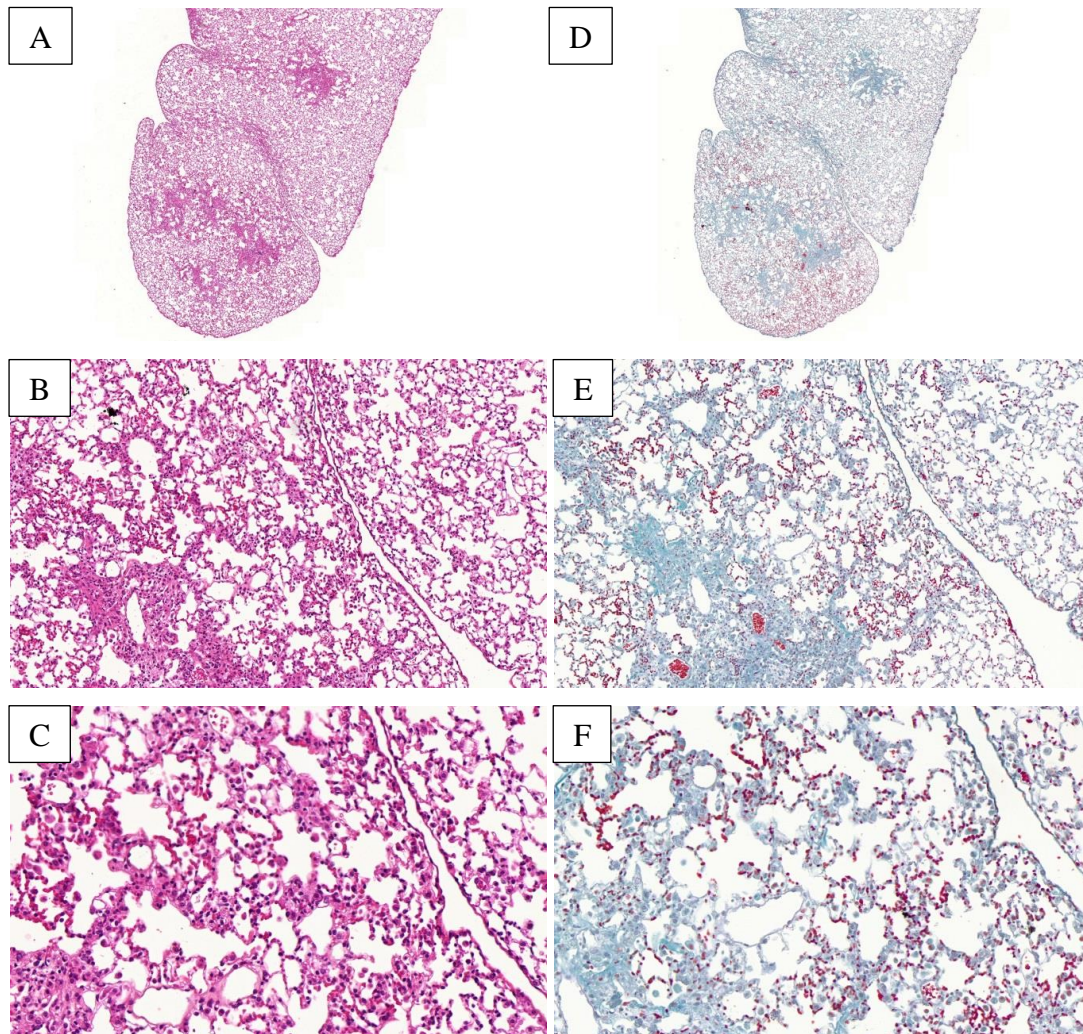
**Abb. 16: Lunge einer SPUC Maus ohne Transgenaktivierung mit ausgeprägten fibrotischen Veränderungen des Lungengerüsts an Tag 28 nach Bleomycinapplikation.**

Links HE-Färbung (A-C), rechts Masson-Goldner-Färbung (D-F) jeweils 2-fach (A+D), 10-fach (B+E) und 20-fach (C+F) vergrößert.



**Abb. 17: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung ab Tag 0 mit leichten fibrotischen Veränderungen des Lungengerüsts an Tag 28 nach Bleomycinapplikation.** Links HE-Färbung (A-C), rechts Masson-Goldner-Färbung (D-F) jeweils 2-fach (A+D), 10-fach (B+E) und 20-fach (C+F) vergrößert.

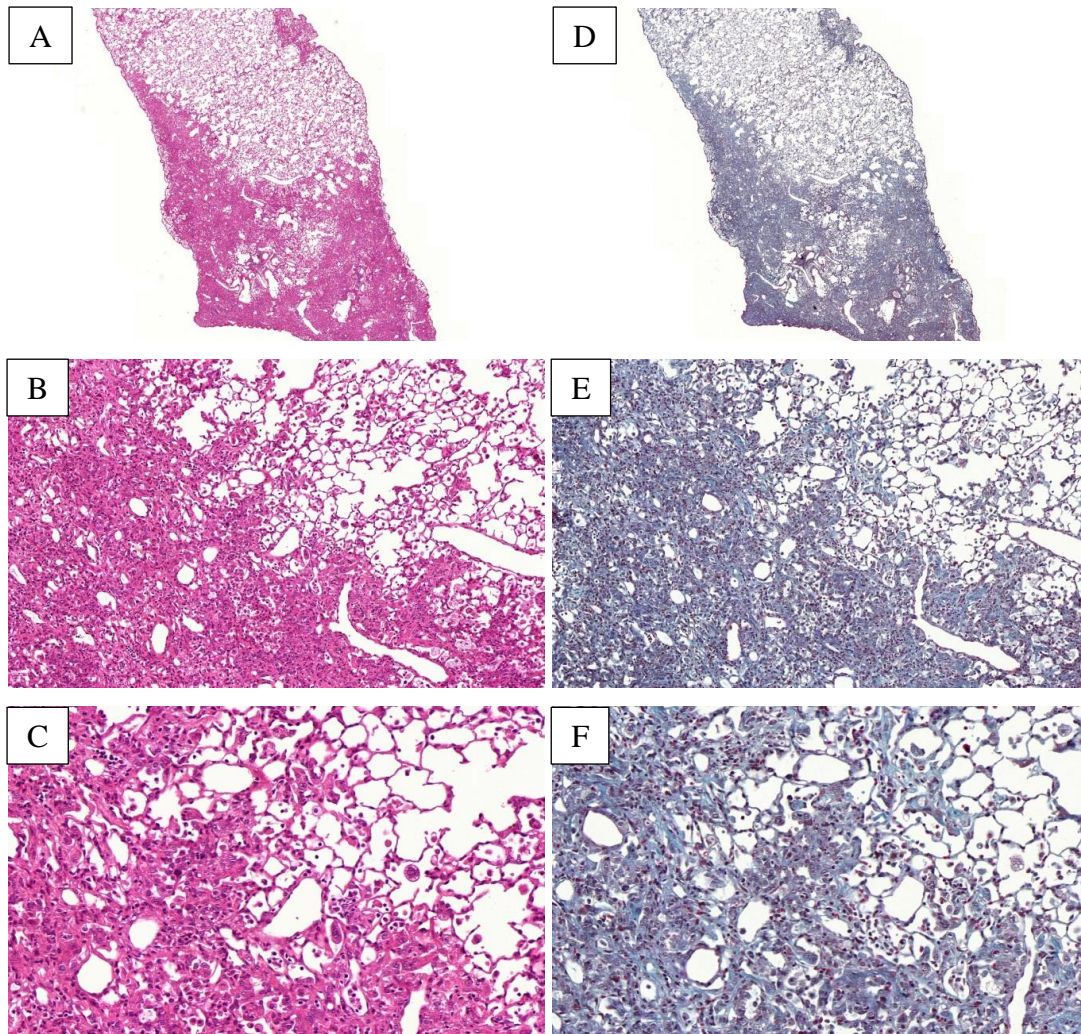




**Abb. 18: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung ab Tag 4 mit leichten fibrotischen Veränderungen des Lungengerüsts an Tag 28 nach Bleomycinapplikation.**

Links HE-Färbung (A-C), rechts jeweils Masson-Goldner-Färbung (D-F) jeweils 2-fach (A+D), 10-fach (B+E) und 20-fach (C+F) vergrößert.





**Abb. 19: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung ab Tag 16 mit fortgeschrittenen fibrotischen Veränderungen des Lungengerüsts an Tag 28 nach Bleomycinapplikation.**

Links HE-Färbung (A-C), rechts Masson-Goldner-Färbung (D-F) jeweils 2-fach (A+D), 10-fach (B+E) und 20-fach (C+F) vergrößert.

Die histologischen Präparate zeigen typische Fibrosezeichen, die je nach Schwere des Verlaufs unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Während die gesunden Mäuse aus der Kontrollgruppe durch ein zartes Alveolengerüst gekennzeichnet sind, zeigten die SPUC-Mäuse nach Bleomycinapplikation die typischen Veränderungen wie Verdickung der Gewebesepten und Verlust der Gasaustauschfläche durch Fibrosierung. Dies ist sowohl in der HE-Färbung als auch in der Masson-Goldner-Färbung zu sehen. Auch eine Zunahme der Zellzahl ist zu beobachten (Abb.16-19). In der Goldner-Masson-Färbung zeigt sich eine ausgeprägte Deposition von Kollagen, dass durch eine vermehrte Grünzeichnung gekennzeichnet ist. Diese

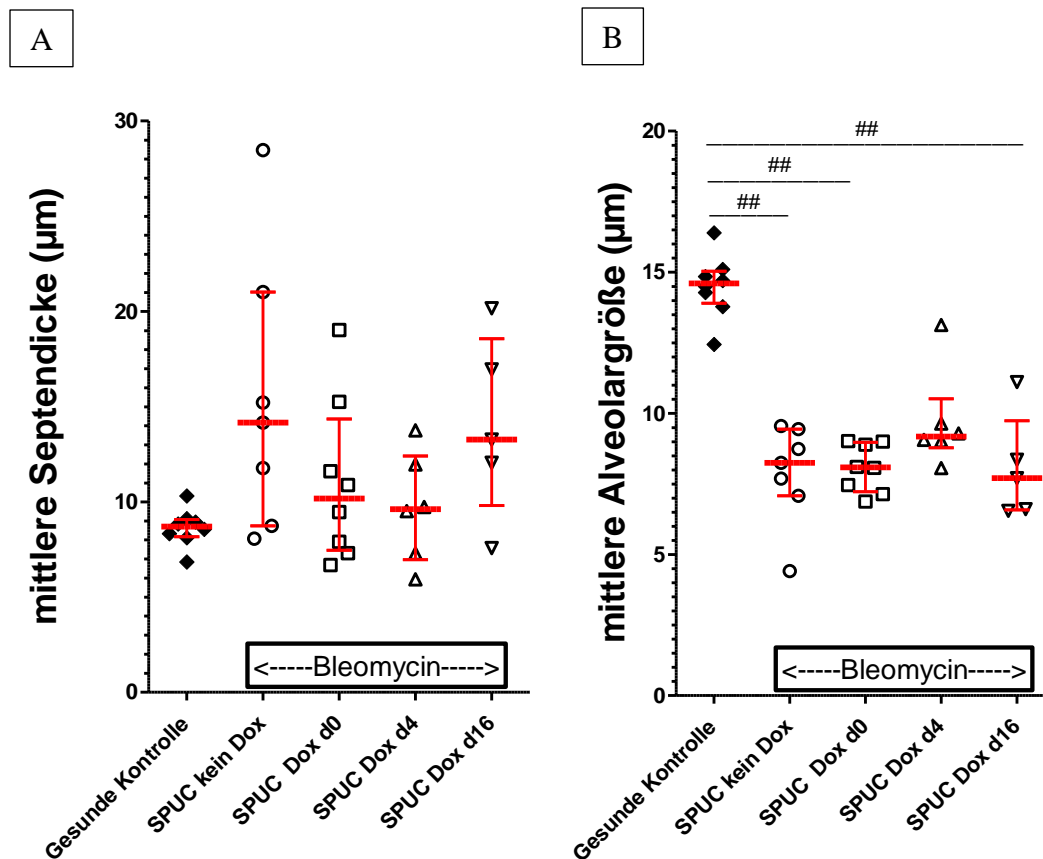
Veränderungen sind bei den Mäusen der Referenzgruppe (ohne Transgenaktivierung) am stärksten ausgeprägt (Abb.16).

Bei den SPUC-Mäusen mit Transgenaktivierung sieht man deutlich reduzierte Fibrosezeichen. Vor allem bei den SPUC-Mäusen mit früher Transgenaktivierung, ab Tag 0 (Abb.17) und Tag 4 (Abb.18), ist die Vermehrung des Lungengerüsts in geringerem Maße ausgeprägt. Dagegen hatte eine Transgenaktivierung ab Tag 16 (Abb.19) nur einen geringen Einfluss auf die Fibroseentwicklung, in dieser Gruppe war eine fortgeschrittene Fibrosierung des Lungengewebes zu sehen. Herdförmige Fibroseareale sind jedoch bei allen bleomycinexponierten Tieren zu sehen. Hier zeigte sich, dass die Fibrose durch Bleomycininduktion primär vom Bronchialbaum ausgeht, und sich peribronchial beginnend ausbreitet.

#### **4.3.2. Septendicke und Alveolengröße**

Zur Quantifizierung der fibrotischen Änderungen in der Histologie wurde eine morphometrische Analyse der H&E-gefärbten Lungenschnitte vorgenommen. Hierzu wurden Anzahl und Stärke der Septendicke und der „Alveolengröße“ (*alveolärer mean linear intercept*) durch ein bildanalytisches Verfahren (SeMeLuG Modul der Axiovision Software) bestimmt.

In der morphometrischen Analyse der histologischen Schnittpräparate ist ein fibrotischer Umbau durch eine Zunahme der mittleren Septendicke sowie einer Verringerung der mittleren Alveolengröße (*alveolärer mean linear intercept*) gekennzeichnet.



**Abb. 20: Mittlere Septendicke (A) und mittlere Alveolengröße (B).**

Die gefärbten Lungenchnittpräparate der gesunden Kontrollgruppe und der SPUC-Mäuse ohne Transgenaktivierung wurden an Tag 28 nach Bleomycinapplikation digital eingescannt und mit einem bildmorphometrischen Verfahren (SeMeLug-Modul, Axiovisionsoftware von Zeiss) analysiert. Dabei wurde jede Mäuselunge vollständig vermessen und ca. 50.000 Einzelmesswerte erfasst. Dargestellt ist die Verteilung der mittleren Septendicke und der mittleren Alveolengröße in µm im Präparat jeder einzelnen Maus (den Gruppen entsprechend je Tier ◆○□△▽). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD. ## ( $p < 0,01$ ) Kruskal-Wallis-Test.

Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (Septendicke im Median 8,7 µm) zeigt die Analyse der mittleren Septendicke eine Zunahme bei den Bleomycin behandelten Referenz-Tieren eine Zunahme um fast das Doppelte (Septendicke im Median 14,1 µm). Auch bei den SPUC-Mäusen nach Transgenaktivierung ist eine Zunahme zu verzeichnen, die jedoch geringer ausfällt. Dieser Effekt ist bei einer SPUC-Induktion ab Tag 0 (10,2 µm im Median) am stärksten ausgeprägt. Die den SPUC-Mäusen mit

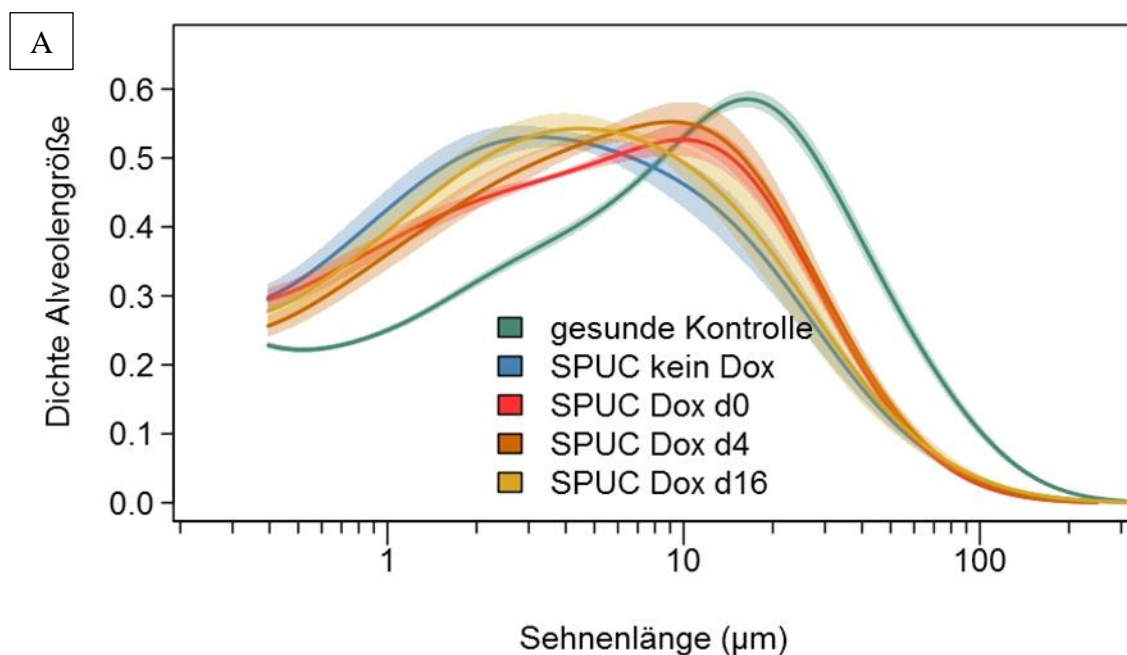


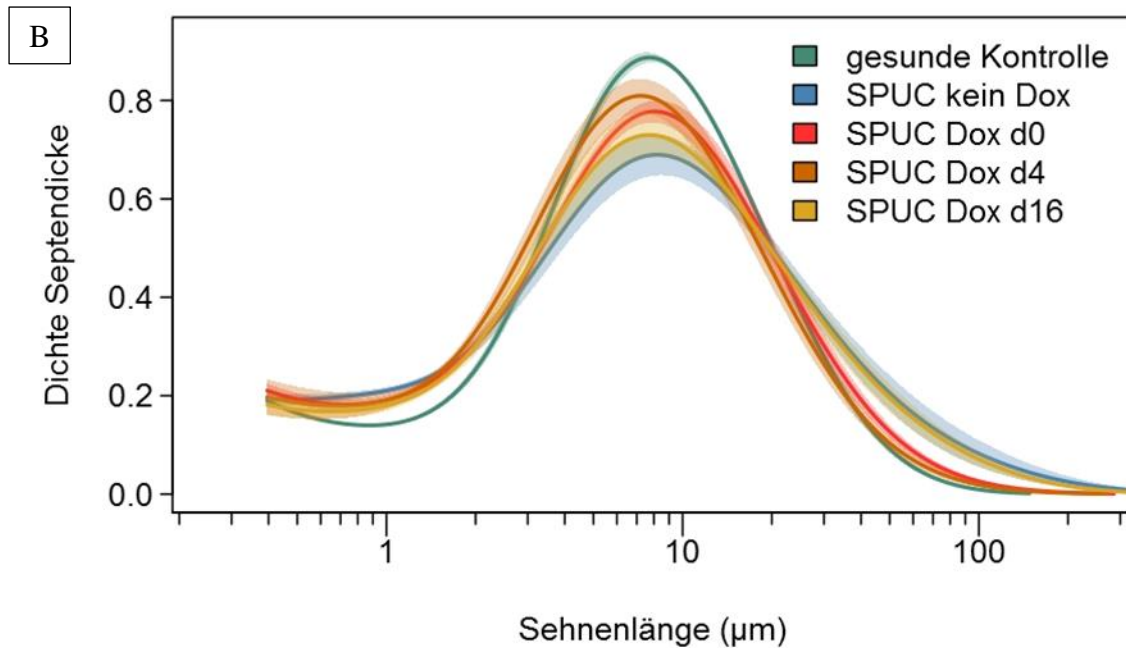
Transgenaktivierung ab Tag 16 liegt die Septendicke mit 13,3  $\mu\text{m}$  im Median im Bereich der Referenztiere ohne Transgenaktivierung. Aufgrund der relativ hohen Streuung der Messwerte sind die Veränderungen nicht signifikant (Abb.20 A).

Bei der mittleren Alveolengröße zeigten sich hochsignifikante Veränderungen bei den bleomycinexponierten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die mittlere Alveolengröße war von 14,6  $\mu\text{m}$  im Median (gesunde Referenzgruppe) auf 8,2  $\mu\text{m}$  im Median bei den bleomycinexponierten Tieren ohne Transgenaktivierung reduziert. Im Vergleich der SPUC-Tiere mit Transgeninduktion zur Referenzgruppe ohne Transgenaktivierung waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten (Abb.20 B).

#### 4.3.3. Häufigkeitsverteilung der Septendicke und der Alveolengröße

Im Verlauf des fibrotischen Umbaus kommt es nicht nur zu einer medianen Veränderung der Septendicke und der Alveolengröße, sondern ebenfalls zu einer Veränderung in der Anzahl dicker und dünner Septen bzw. kleiner und größerer Alveolen. Durch eine Darstellung der Mediane wird diese Umverteilung möglicherweise maskiert. Daher wurde in den folgenden Diagrammen eine Kerndichteschätzung der Septendicken und Alveolengrößen in Abhängigkeit von der Sehnenlänge durchgeführt.





**Abb. 21: Dichteverteilung der Septendicke (A) und der Alveolengröße (alveolärer mean line intercept) (B)**

Die Dichten wurden durch Kerndichteschätzung nach der Parzen-Fenster-Methode ermittelt. Als Kernfunktion wurde die Dichte der Normalverteilung  $N(\mu, \sigma^2)$ , Bandbreite  $\sigma = 0,2\mu\text{m}$  verwendet. Grundlage der Kerndichteschätzung sind die Daten individueller Proben. Die gezeigten Kurven sind die punktweisen Mittelwerte der individuellen Dichten aller Proben der gleichen Gruppe. Die Breite der Bänder oberhalb und unterhalb der Kurven entsprechen den punktweisen Standardfehlern.

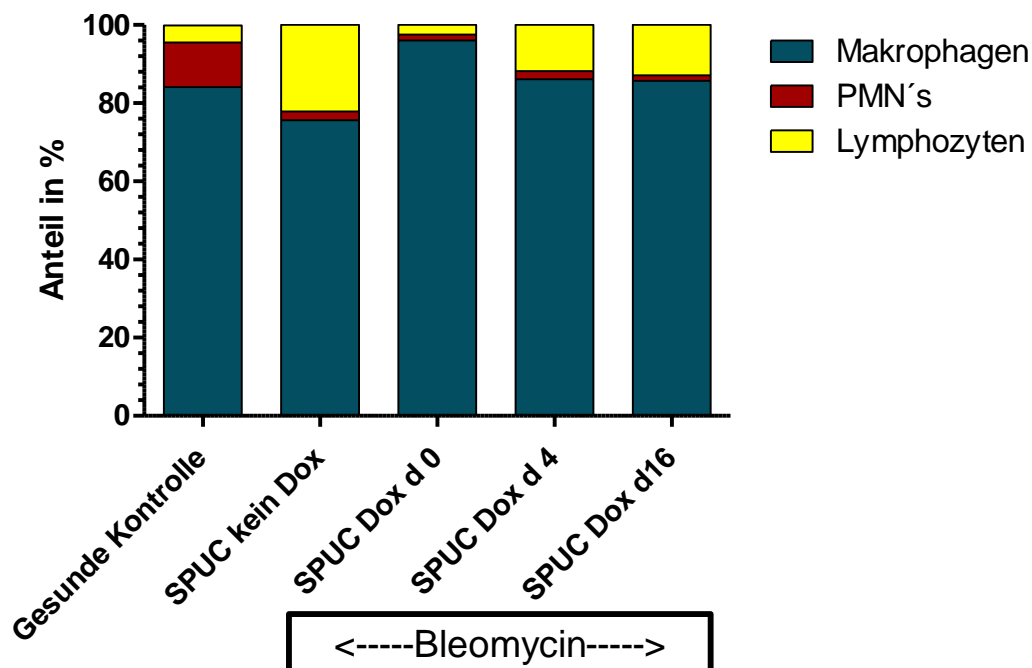
Aus der Verteilungskurve für die Septendicke (Abb. 21 A) ist ersichtlich, dass es im Verlauf der Fibrosierung zu einer Abnahme der Septen im mittleren Größenbereich kommt und der Anteil sowohl kleiner Septendicken ( $<3\mu\text{m}$ ) wie auch großer Septendicken ( $>30\mu\text{m}$ ) ansteigt. Das Verteilungsmuster von Mäusen ohne Transgenaktivierung und das der SPUC Mäuse mit Transgenaktivierung ab Tag 16 ist nahezu deckungsgleich. Lediglich im Bereich der mittleren Septendicken ( $3\text{--}30\mu\text{m}$ ) ist ein Effekt der Transgenaktivierung zu sehen. Die Verteilungskurven für die frühe Transgenaktivierung (Tag 0 und Tag 4) liegen zwischen denen der gesunden Kontrollgruppe und der Referenzgruppe ohne Transgenaktivierung und lassen einen therapeutischen Effekt der SPUC Expression erkennen.

Ähnlich verhält es sich mit den Verteilungskurven für die Alveolengröße (Abb. 21 B). In der Referenzgruppe ohne Transgenaktivierung und in der Gruppe SPUC mit

Transgenaktivierung ab Tag 16 ist eine deutliche Linksverschiebung hin zu kleineren Alveolengrößen zu erkennen. Auch hier sind beide Verteilungskurven nahezu deckungsgleich und nur ein geringer therapeutischer Einfluss der SPUC Aktivierung zu erkennen. Auch die SPUC Gruppen mit früher Transgenaktivierung (Tag 0, Tag 4) weisen im Vergleich zur gesunden Kontrolle einen hohen Anteil kleiner Alveolen ( $<10\mu\text{m}$ ) und geringeren Anteil großer Alveolen ( $>20\mu\text{m}$ ) auf, allerdings ist hier ein deutlicher therapeutischer Effekt und eine Annäherung an das Verteilungsmuster der gesunden Kontrollmäuse zu erkennen

#### 4.4. Zelldifferenzierung

Zur Untersuchung, inwieweit durch eine SPUC-Transgenaktivierung entzündliche Prozesse in der Lunge beeinflusst werden, wurden von den Lungenlavagen Cytospins angefertigt und ein Differentialzellbild erstellt. Unterschieden wurden hier Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten. Typischerweise kommt es bei der Bleomycin-induzierten Fibrose zu einer Zunahme des relativen Anteils der Granulozyten und Lymphozyten und einer Abnahme der Makrophagen.



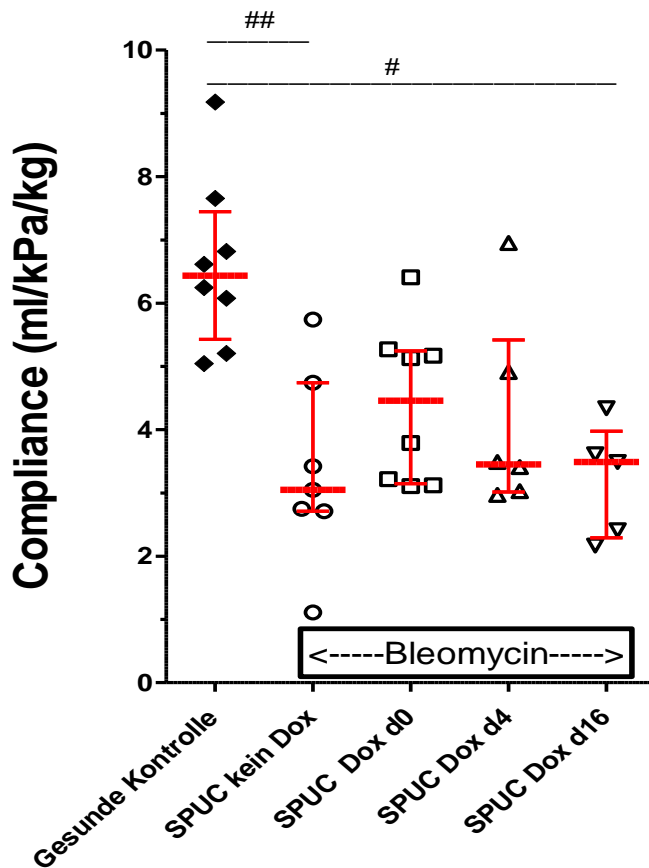
**Abb. 22: Zelldifferenzierung**

Dargestellt sind die relativen Anteile an Makrophagen, Granulozyten (PMN) und Lymphozyten aus den Lungenlavagen.

Die Zelldifferenzierung ergab, dass in der unbehandelten Kontrollgruppe wie auch in allen übrigen Gruppen die Makrophagen die größte Fraktion in der BAL darstellen. Den mit 96 % höchsten Anteil gibt es in der Gruppe SPUC mit Transgenaktivierung ab Tag 0 und den niedrigsten in der Referenzgruppe ohne Transgenaktivierung (76 %). Zudem zeigte sich in der unbehandelten gesunden Kontrollgruppe ein höherer Anteil an Granulozyten als in den übrigen Gruppen. Dieser fiel mit 11% unerwartet hoch aus. In den bleomycinbehandelten Gruppen lag der Anteil der Granulozyten konstant um 1-2 %. In der Bleomycin-exponierten Gruppe ohne Transgenaktivierung stellt sich der höchste Anteil an Lymphozyten (ca. 22%) dar. Die SPUC Expression hatte einen deutlichen Einfluss auf die Lymphozytenzahl, die mit dem Zeitpunkt der Transgenaktivierung korrelierte. Bei Tag 0 betrug der Lymphozytenanteil ca. 3%, bei Tag 4 ca. 11% und bei Tag 16 ca. 13% (Abb. 22).

#### **4.5. Compliance**

Die Compliance, also die Dehnbarkeit der Lunge, ist ein Marker für den fibrotischen Gewebsumbau und verringert sich mit zunehmendem bindegewebigen Anteil des Lungengewebes wie auch infolge einer Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung. Je mehr Bindegewebe im Lungengewebe angereichert wird, desto steifer und unelastischer wird die Lunge. Es ist ein höherer Beatmungsdruck notwendig um die Lunge mit einem bestimmten Volumen zu beatmen, entsprechend fällt der bei der Compliancemessung bestimmte Quotient aus Volumen und Druck niedriger aus.



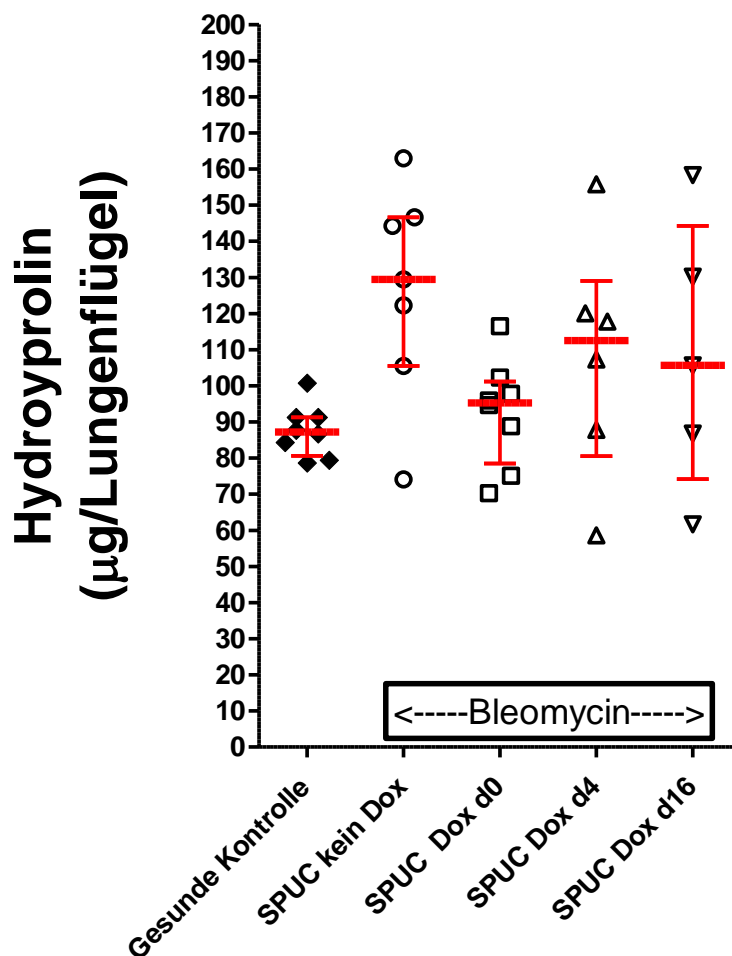
**Abb. 23: Compliancemessung des Lungengewebes an Tag 28**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Compliancemessung der Lungen der einzelnen Mäuse (den Gruppen entsprechend je Tier ◆○□△▽) an Tag 28. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD. # ( $p<0,05$ ), ## ( $p<0,01$ ) Kruskal-Wallis-Test.

Im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren zeigte sich erwartungsgemäß eine hochsignifikante Abnahme der Lungencompliance nach Bleomycinapplikation (3,4 ml/kPa/kg für die Referenzgruppe ohne Transgenaktivierung versus 6,6 ml/kPa/kg für die gesunde Kontrollgruppe). In der Gruppe der SPUC-Mäuse mit Transgenaktivierung ab Tag 0 war die Compliance im Mittel deutlich verbessert (4,4 ml/kPa/kg), aufgrund der Streuung der Messwerte und der geringen Anzahl der Tiere jedoch statistisch nicht signifikant. Die übrigen Gruppen mit Transgenaktivierung lagen im Bereich der Referenzgruppe; es zeigte sich kein Einfluss der SPUC Expression (Abb. 23).

#### 4.6. Hydroxyprolinbestimmung

Die  $\alpha$ -Aminosäure Hydroxyprolin kommt im Körper in Kollagen und Elastin, also im Bindegewebe vor. Es wird durch Hydroxylierung aus der Vorstufe Prolin gebildet. Nimmt der Anteil an Kollagen in der Lunge zu, wie es bei der IPF der Fall ist, spiegelt sich dieses in einem erhöhten Hydroxyprolingehalt im Gewebe wider.



**Abb. 24: Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe an Tag 28.**

Dargestellt ist die Gesamtmenge Hydroxyprolin in  $\mu\text{g}$  in einem Lungenflügel der einzelnen Mäuse (den Gruppen entsprechend je Tier  $\blacklozenge \circ \square \triangle \nabla$ ). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SD. Kruskal-Wallis-Test.

Passend zum Verlust der Compliance zeigen die bleomycinexponierten Tiere einen Anstieg des Hydroxyprolinspiegels. Der war in der Gruppe der Referenztiere ohne SPUC-Induktion mit 129 µg/Lungenflügel im Median am höchsten, jedoch nicht signifikant gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (87 µg/Lungenflügel im Median) erhöht. Die SPUC-Mäuse zeigten im Mittel geringere Hydroxyprolinspiegel im Lungengewebe. Hierbei wiesen die Tiere mit Transgenaktivierung an Tag 0 die niedrigsten Spiegel mit 95 µg/Lungenflügel im Median auf. Die Veränderung war jedoch nicht signifikant (Abb. 24).

## 5. Diskussion

Die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) stellt die gravierendste Form interstitieller Lungenerkrankungen dar und ist durch einen progressiven Verlauf gekennzeichnet, der zu einem rapiden Verlust der körperlichen Leistungsfähigkeit, Beeinträchtigung der Lungenfunktion und Abnahme der Lebensqualität führt [Behr, 2013]. Bislang existieren nur wenige effektive Pharmakotherapieoptionen. Neben einer gesteigerten Apoptose alveolärer Typ II Zellen ist die Lungenfibrose pathomechanistisch durch schwerwiegende Störungen des alveolären Gerinnungsgleichgewichts, mit einer Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und Suppression fibrinolytischer Komponenten, sowie ausgeprägten Surfactantveränderungen, die zu einem Verlust der Oberflächenspannungsregulation in den Alveolen mit erhöhter Atelektaseneigung und Ventilations-/Perfusionsstörungen (*Shunt flow*) führen, gekennzeichnet [Crystal, 1981; Selman, 2001; Wauer, 2004]. Urokinase (uPA) ist der prädominante Plasminogenaktivator im alveolären Kompartiment und wird unter Bedingungen einer IPF in seiner Aktivität durch den Inhibitor PAI-1 praktisch vollständig inhibiert [Loof, 2014; Günther, 2000; Idell, 1991]. Neben seiner fibrinolytischen Aktivität kann uPA auch zelluläre Effekte vermitteln, die sich protektiv auf das Überleben und die Proliferation von Lungenepithelzellen auswirken, z.B. über die Aktivierung von Hepatozytenwachstumsfaktor/HGF oder die Suppression des Apoptoseinduktors p53 [Naldini, 1995; Shetty, 2008]. In Tiermodellen der akuten Lungenschädigung mit nachfolgender Fibrose (Bleomycin Modell) führte die transbronchiale Applikation bzw. die Überexpression von uPA zu einem erhöhten Überleben und einer attenuierten Fibroseentwicklung [Günther, 2003; Sisson, 2002]. Ähnlich positive Effekte konnten bereits in Kaninchenlungen gezeigt werden, die nach Bildung des Fibrinpolymers mit vernebelter Urokinase und Surfactant behandelt wurden. Hier war eine kombinierte Gabe von Surfactant und Urokinase der Einzelgabe überlegen und führte zu einer weitreichenden Verbesserung der Oxygenierung und Reduktion des Shunt Flusses [Schermuly, 2001]. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von alveolären Fibrinablagerungen, der Inkorporation von Surfactantkomponenten in alveoläre Fibringerinnsel, einer erhöhten anti-fibrinolytischen Aktivität im Alveolarraum und einem Funktionsverlust pulmonalen Surfactants, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiges Surfactant Protein B-Urokinase Fusionsprotein, genannt SPUC, entwickelt und durch chemische Kopplung [Ruppert, 2003] bzw.



rekombinante Expression in CHO Zellen hergestellt [Ruppert, 2008]. Die in vitro Charakterisierung zeigte, dass dieses Protein im Vergleich zu nativer uPA eine verbesserte fibrinolytische Aktivität gegenüber alveolärem (Surfactant-haltigem) Fibrin und eine verbesserte PAI-1 Resistenz besitzt, sowie über die gleichen biophysikalischen Eigenschaften verfügt wie natives SP-B [Ruppert, 2003]. Aufgrund der verbesserten fibrinolytischen sowie der zusätzlichen biophysikalischen Eigenschaften, die ein pulmonales und intra-pulmonales Targeting von SPUC erlauben (präferentielle Verteilung innerhalb der Lunge an alveoläres, Surfactant beladenes Fibrin), stellt SPUC möglicherweise ein attraktives neues Therapiekonzept für die IPF dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden tierexperimentelle Versuche mit transgenen Mäusen ausgewertet, die das SPUC-Fusionsprotein induzierbar im alveolären Epithel durch Doxycyclingabe überexprimieren. Dabei wurde gezielt der Frage nachgegangen, ob die Überexpression von SPUC in der Lage ist eine Fibroseentwicklung zu verhindern oder die Progression zu verlangsamen und ob es Unterschiede im Verlauf der Fibrose oder in Bezug auf das Überleben der Tiere gibt, wenn die Transgenaktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt. Hierzu wurde an Bleomycin-geschädigten Mäusen das Transgen entweder zu Beginn der Bleomycinschädigung (Tag 0), zu einem frühen Zeitpunkt während der inflammatorischen Phase (Tag 4) oder zu einem späten Zeitpunkt während der fibroproliferativen Phase (Tag 16) aktiviert, und an Tag 28 das Ausmaß der Fibrose anhand lungenfunktioneller, biochemischer und histologischer Parameter ermittelt.

Nach Bleomycinapplikation entwickelten die Mäuse eine Lungenfibrose, die lungenfunktionell (Compliance), sowie durch biochemische und histologische Analysen näher charakterisiert wurde. Eine frühe Aktivierung des Transgens, welches die SPUC-Produktion einleitet, zeigte dabei den größten protektiven Einfluss auf die Fibroseentwicklung. Im Vergleich der Versuchsgruppen schnitten die Tiere mit Transgenaktivierung ab Tag 0 beim Überleben und Parametern wie der Gewichtsentwicklung der Tiere, der pulmonalen Compliance, Hydroxyprolinegehalt im Gewebe und der morphometrischen histologischen Analyse am besten ab. Wenngleich viele Parameter zur nur bleomycinexponierten Referenzgruppe nicht signifikant verschieden waren, war doch ein deutlicher Trend hin zu normalisierten Werten der gesunden Kontrollen zu beobachten. Auch bei einer Transgenaktivierung

ab Tag 4 war noch ein positiver Effekt auf die Fibroseentwicklung zu beobachten, fiel insgesamt aber schwächer aus. Eine Transgenaktivierung ab Tag 16 zeigte jedoch überhaupt keinen positiven Einfluss, die gemessenen Werte unterschieden sich nicht von der nur mit Bleomycin behandelten Referenzgruppe und ging sogar mit einer höheren Letalität der Tiere einher.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit vergleichbaren Studien am Bleomycinmodell, bei denen versucht wurde durch Urokinasegabe oder Urokinaseüberexpression die gestörte Hämostaseregulation zu korrigieren. In einer Versuchsreihe aus dem Jahr 2002 [Sisson, 2002] wurden Mäuse (CCSP-rtTA/tetO-muPA) mit einem ähnlichen Expressionssystem für Urokinase, wie bei den SPUC-Mäusen verwendet.

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse, deren Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) deaktiviert wurde, vor dem Einfluss der bleomycininduzierten Fibrose geschützt waren [Eitzman, 1996; Hattori, 2000]. Auf dieser Grundlage wurden transgene Mäuse (CCSP-rtTA/tetO-muPA) mit einem tetrazyklinabhängigen (Doxycyclin) pulmonalen Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (u-PA) gezüchtet. Bei diesen Tieren zeigte sich nach Aktivierung des tetrazyklinabhängigen uPA-Systems vier bzw. sieben Tagen vor Bleomycinexposition eine reduzierte Mortalität der doppelt transgenen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne entsprechende Transgenaktivierung. Es reicherte sich weniger Kollagen im Lungengerüst an und der Hydroxyprolingehalt in der BAL war vermindert [Sisson, 2002; Sisson, 2007].

Diesen positiven Effekt einer frühen Transgenaktivierung konnten wir in der hier vorliegenden Studie mit den SPUC-Mäusen ebenfalls nachweisen. Im Gegensatz zu den geschilderten Versuchen mit SPUC-Mäusen wurde in der Studie von Sisson et al. das Urokinase-Transgen nicht zu späteren Zeitpunkten nach Bleomycinapplikation angeschaltet, sodass ein direkter Vergleich zwischen dessen und unseren Versuchen mit später Transgenaktivierung nicht möglich ist.

Hierzu im Gegensatz steht die Studie von Günther et al. [Günther, 2003]. In dieser Studie wurden Kaninchen im Bleomycinmodell der Lungenfibrose verwendet. Die Tiere wurden in einer frühen (2-12 Tage nach Bleomycinapplikation) und einer späten Phase (Tag 14-24 nach Bleomycinapplikation) mit einem u-PA-Aerosol oder einem Heparinaerosol behandelt. Es wurden Untersuchungen der Compliance, eine histologische Aufarbeitung, sowie Bestimmungen von löslichem Kollagen in der BAL und eine Hydroxyprolinanalyse durchgeführt. Hier erwies sich eine späte

Urokinasegabe während der fibroproliferativen Phase (Tag 14-24) als besonders wirksam, wohingegen in der hier beschriebenen Studie kein Benefit einer späten Transgenaktivierung mehr zu erkennen war.

Das Ausbleiben eines therapeutischen Effektes bei Aktivierung des Transgens in der Spätphase und die nicht signifikanten Veränderungen bei einer Aktivierung zu frühen Zeitpunkten nach Bleomycinschädigung gegenüber positiven Ergebnissen aus anderen Studien führt zu folgenden Überlegungen:

- 1) Das verwendete Modell ist ungeeignet
- 2) Es existieren Speziesunterschiede bei der Entwicklung einer Lungenfibrose
- 3) Es existieren Fehler im Versuchsaufbau, methodische Fehler oder die Readoutparameter sind nicht geeignet
- 4) Die fibrinolytische und bzw. oder biophysikalische Aktivität von SPUC war unzureichend oder die Expression im Verlauf abfallend
- 5) Die Fibrinbildung spielt für die Fibroseentwicklung *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle

#### *Ad 1) Das Bleomycinmodell der Lungenfibrose*

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Fibroseinduktion das Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose verwendet. Dies hat den Vorteil, dass bereits ausreichend Daten zum Modell bestehen, und dessen Vor- und Nachteile bekannt sind.

Das Zytostatikum Bleomycin wird von Streptomyces-Arten gebildet, und bewirkt durch Einbau seiner Ringsysteme in die DNA Strangbrüche. Dies geschieht durch eine Interaktion am N-terminalen Ende der Glykopeptide mit der DNA [Lüllmann, 2010].

Es gibt verschiedene Arten das Bleomycin zur Fibroseinduktion zu applizieren. Im Rahmen dieses Experimentes wurde es als Aerosol intratracheal über einen Tubus appliziert, wodurch kaum systemischen Nebenwirkungen wie bei der intravenösen, intraperitonealen und der intrapleurale Applikation zu erwarten sind.

Eine häufige Nebenwirkung von Bleomycin ist die akute Pneumonitis die im klinischen Einsatz im Verlauf in einer Lungenfibrose münden kann. Im Tiermodell wird diese Wirkung bewusst ausgenutzt. Nach trachealer Vernebelung des Bleomycins konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach der

initialen akuten Entzündungsreaktion der Lunge zu einer zunehmenden Fibrosierung kam. Dies ließ sich im histologischen Übersichtspräparat in der HE-Färbung anhand von einer Septenverdickung und Verlust von Gasaustauschfläche und auch anhand weiterer Parameter wie der Compliancemessung und einer Hydroxyprolinzunahme im Lungengewebe nachweisen.

Grundlegend wichtigster Unterschied des hier verwendeten Bleomycinmodells zum klinischen Verlauf der Lungenfibrose ist jedoch die einfache Tatsache, dass es sich hierbei um ein entzündlich-getriggertes Modell handelt, die Entzündung für die Pathogenese der IPF jedoch eher eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch gibt es viele Parallelen zwischen der bleomycininduzierten Fibrose und der IPF. Grundsätzlich sind die gleichen Signalwege und Faktoren an der Entstehung der Lungenfibrose beteiligt, wie z.B. TGF- $\beta$  [Coker, 1997] oder PDGF [Gurujeyalakshmi, 1999]. In Versuchen mit dem Bleomycinmodell konnten Idell et al. bei Primaten und Olman et al. bei Mäusen eine Aktivierung des Gerinnungssystems nachweisen [Idell, 1987; Olman, 1995]. Auch ein Protein-*Leakage* sowie eine veränderte Zusammensetzung der Surfactant- Phospholipide sind bei der bleomycininduzierten Fibrose zu beobachten [Thrall, 1987].

Für diese Versuchsreihe hielten wir in Zusammenschau der Ergebnisse und auch der Ergebnisse anderer Forschungsgruppen an diesem Modell fest, da die Ergebnisse bei exakter Einhaltung und Anpassung der Bleomycindosis an das jeweilige Körpergewicht des Tieres sehr gut reproduzierbar sind. Somit ist das Modell gut geeignet, um den Verlauf mit der ARDS-Frühphase und der konsekutiven Fibrosierung darzustellen und eine positive Beeinflussung des Erkrankungsverlaufs zu untersuchen.

#### *Ad 2) Speziesunterschiede der Fibroseentwicklung*

Das Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose ist ein etabliertes und verbreitetes Fibrosemodell, dass in Versuchen mit verschiedenen Säugetierspezies genutzt wurde [Bigby, 1985; Wild, 1994; Jones, 1998; Brozmanova, 2004].

Im Hinblick auf das Gerinnungssystem zeigte sich, dass der Ablauf der Fibroseentwicklung im Kaninchen und Mausmodell unterschiedlich ist. In einer Kaninchen-Studie von Günther et al. konnte nachgewiesen werden, dass der prokoagulatorische Verlauf in den ersten 16 Tagen gesteigert war, sich im Verlauf bis Tag 28 aber wieder normalisierte [Günther, 2003]. Im Mausmodell der

bleomycininduzierten Lungenfibrose zeigt sich jedoch in Studien über Tag 28 hinaus eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität [Wygrecka, 2007]. Somit ist von gewissen speziesabhängigen Unterschieden der Gerinnungsantwort im Verlauf der Fibroseentwicklung auszugehen.

### Ad 3) *Methodische Aspekte/Fehlerquellen im Versuchsaufbau*

Für dieses Experiment wurden nur kleine Gruppen (n=8) untersucht, was in gewisser Weise die Aussagekraft mindert. Durch die Heterogenität der Fibroseverläufe und damit verbundene große Streuung der erhobenen Messwerte, konnten nicht immer signifikante Ergebnisse erzielt werden. Dies könnte durch eine erweiterte Studie mit höheren Tierzahlen unter Umständen ausgeglichen werden. Dem gegenüber stehen eher ethische Fragen der Rechtfertigung eines solch umfangreichen Tierversuchs.

Hinzu kommt, dass es bei zu fulminant verlaufender Fibroseentwicklung zu einem vorzeitigen Versterben der Tiere oder zur vorher notwendigen Euthanasie kam. Diese Tiere standen zur endgültigen Beurteilung am Versuchsende nicht mehr zur Verfügung, was vor Allem für die statistische Auswertung einen großen Nachteil hat. Den überlebenden Tieren ging es vergleichsweise gut und es zeigten sich geringere Unterschiede zu den Referenzgruppen, möglicherweise ein „*survival of the fittest*“-Effekt.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt das verwendete Tet-on System zur Überexpression des SPUC-Transgens dar. Im Gegensatz zu der Studie von Sisson et al., in der sich die CCSP-rtTA gesteuerte Überexpression von uPA positiv auf die Fibroseentwicklung auswirkte [Sisson, 2002], wurde bei SPUC-Mäusen eine SPC-rtTA Aktivatorlinie verwendet. Der SPC-Promotor steuert die rtTA Expression im respiratorischen Epithel, vornehmlich in TYP-II Pneumozyten, während der CCSP-Promotor auch verstärkt in Bronchialzellen aktiv ist. Die prinzipielle Eignung des SPC-rtTA Systems zur Überexpression von Transgenen konnte jedoch in verschiedenen Studien belegt werden [Besnard, 2010].

Ein weiterer Unterschied zur Studie von Sisson et al. ist, dass dort murines uPA überexprimiert wurde, in SPUC-Mäusen jedoch humanes uPA in das Konstrukt kloniert wurde.

In dieser Versuchsanordnung wurde unter anderem das Gewicht der Tiere als unspezifischer Parameter des Gesundheitszustandes festgelegt. Es besteht jedoch eine gute Korrelation zwischen einem ausgeprägten Gewichtsverlust, im Verhältnis zum

Ausgangsgewicht und der Ausprägung fibrotischer Veränderungen z.B. in der histologischen Analyse oder in einer verminderten Compliance.

Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben eines therapeutischen Effektes könnte sein, dass die gewählten Readoutparameter nicht geeignet sind, um eine Fibroseentwicklung zu charakterisieren. Ein Hauptparameter für die Entwicklung einer Fibrose stellt die pulmonale Compliance, also das Maß für die Dehnbarkeit der Lunge dar. Ein erhöhter Gehalt des interstitiellen Gewebes an Kollagen und Bindegewebe, wie er bei interstitiellen Lungenerkrankungen wie der IPF vorkommt, vermindert die Dehnbarkeit [Imokawa, 1997; Sun, 2003; Peres e Serra, 2006]. Daher ist die Bestimmung der Compliance als Parameter der Fibrosequantifizierung weit verbreitet und hat sich immer wieder in Studien bewährt [Organ, 2015; Bachofen, 1982; Günther, 2003]. Auch in der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es nach Bleomycinapplikation zu einer vermehrten Kollagenanreicherung kommt (siehe Histologie, Masson-Goldner Färbung) und entsprechend zu einer signifikanten Reaktion der Compliance.

Die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes im Lungengewebe ist ebenfalls ein Standardverfahren zur Quantifizierung der Fibrose. Hydroxyprolin kommt in erster Linie im Bindegewebe, vor allem im Kollagen, vor [Wang, 2015; Adamson, 1988]. Schwierig stellte sich hier die Auswertung dar, weil es zu einer sehr breiten Streuung der Ergebnisse kam. Kritisch zu betrachten ist dabei, dass nicht die ganze Lunge oder ein ganzer Lungenflügel, sondern nur kleine Teile des Lungengewebes analysiert wurden. Die Fibroseentwicklung in der gesamten Lunge ist jedoch sehr heterogen, somit kann der Hydroxyprolingehalt im untersuchten Gewebstück sehr stark variieren. Zur Standardisierung wurde der Hydroxyprolingehalt auf den gesamten Lungenflügel rückgerechnet. Zur Vermeidung dieser Fehlerquelle wäre es besser einen ganzen Lungenflügel bzw. ganze Lunge zu homogenisieren, jedoch stünde dieses Gewebe dann weiteren Analysen nicht mehr zur Verfügung.

*Ad 4) Die fibrinolytische und bzw. oder biophysikalische Aktivität von SPUC war unzureichend oder die Expression im Verlauf abfallend*

Aus Voruntersuchungen (nicht gezeigt), war bekannt, dass die fibrinolytische Aktivität in der Lunge der SPUC-Mäuse unterschiedlich ausgeprägt war. Um die

fibrotische Aktivität über den gesamten Versuchsablauf nachzuweisen, wäre zu Beginn und am Versuchsende eine Bestimmung der uPA-Aktivität sinnvoll gewesen. So hätten sich möglicherweise Hinweise auf inhibitorische Faktoren der uPA (z.B. erhöhte Konzentrationen von PAI-1), die die fibrinolytische Aktivität verringern, ergeben. Denkbar wäre auch eine Bestimmung des Fibringehaltes der Lunge am Versuchsende.

Das SPUC-Fusionsprotein hat neben einem Urokinaseanteil einen SP-B-Anteil. Die biophysikalische Aktivität von SPUC wurde bei der Entwicklung des Konzeptes, im Rahmen einer chemischen Kopplung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass nach Fusion mit uPA, die volle biophysikalische Aktivität des SP-B-Anteils erhalten bleibt [Ruppert, 2003]. Untersuchungen zu biophysikalischen Aktivität des Surfactant in SPUC-Mäusen konnte in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt werden, da nicht ausreichend Lavagen für die Messungen zur Verfügung stand.

*Ad 5) Die Fibrinbildung spielt für die Fibroseentwicklung in vivo nur eine untergeordnete Rolle*

Die Überlegung, dass Fibrinbildung und Inkorporation von Surfactant eine relevante Rolle bei der Entwicklung einer Fibrose spielen, ist durchaus belegt. Olman et al. zeigten 1995 bei der bleomycininduzierten Fibrose im Mausmodell eine bedeutende Rolle von PAI-1 für die Fibroseentwicklung [Olman, 1995]. Diese Idee wurde aufgegriffen und an PAI-1 defizienten Mäusen weiterverfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Tiere durch die daraus resultierende erhöhte Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, in gewissem Maß vor der Fibroseentwicklung geschützt sind und weniger Kollagen angereichert wird [Eitzman, 1996; Hattori, 2000]. In Analogie dazu bewirkte die lungenspezifische Überexpression von uPA eine Steigerung der Fibrinolyse und Attenuierung der Fibroseantwort [Sisson, 2002; Sisson, 2007].

Der These, dass das Fibrinogen eine entscheidende Rolle bei der Fibroseentwicklung spielt, widersprechen Arbeiten mit fibrinogendefizienten Mäusen, die entgegen der Erwartung nicht vor der Entstehung einer Lungenfibrose geschützt waren. Diese Knock-out-Tiere zeigten keine nachweisliche Fibrinogenproduktion mehr, wiesen jedoch eine mit Wildtyp-Mäusen vergleichbare Fibroseentwicklung nach Bleomycingabe auf [Wilberding, 2001; Ploplis, 2000]. Gleichermaßen waren Kaninchen vor der bleomycininduzierten Fibrose weitgehend geschützt, wenn sie Heparin zu einem frühen Zeitpunkt nach Bleomycingabe erhielten und somit die

Fibrinbildung verhindert wurde, bzw. nach uPA-Gabe zu einer späten Phase, in der gebildetes alveoläres Fibrin aufgelöst wurde [Günther, 2003]. Wenngleich Fibrin alleine nicht ausreichend für eine Fibroseentwicklung ist, scheint es jedoch die Entstehung einer Fibrose zu begünstigen und von pathogenetischer Bedeutung zu sein.

In einer Studie von Kubo et al aus dem Jahr 2008 zeigte sich ein besseres Outcome von Patienten die neben Prednisolon auch mit dem oralen Antikoagulant Warfarin (Vitamin-K Antagonist) behandelt wurden. Die Patienten erhielten jedoch auch zeitweise, in Phasen der Hospitalisierung, niedermolekulares Heparin [Kubo, 2008]. Folglich gab es eine groß angelegte Studie in der IPF-Patienten mit einer Langzeit-Warfarin-Therapie behandelt wurden um die erhöhte Gerinnungsneigung, die bei der IPF mit ursächlich zu sein scheint, zu behandeln. Diese Studie scheiterte jedoch, da die Gabe des oralen Antikoagulanz mit einer erhöhten Mortalität einherging und die Langzeitstudie abgebrochen werden musste [North, 2012]. Auch dieses Ergebnis steht der Stellung des Fibrins in der Entstehung einer IPF entgegen.

Möglicherweise spielen beim SPUC-Fusionsprotein neben seinem Einfluss auf die Fibrinbildung jedoch auch epithelprotektive Einflüsse auf das Alveolarepithel eine Rolle. Die Hemmung der Apoptoseinduktion in alveolären Epithelzellen führt zu einer Verminderung des Epithelschadens und damit zu einem verminderten fibrotischen Umbau. SPUC hat durch seinen uPA-Anteil die Möglichkeit zelluläre Kaskaden auszulösen: Die Aktivierung von Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), dessen Expressierung bei der IPF vermindert ist, hat einen antiapoptotischen Effekt auf Alveolarepithelzellen [Naldini, 1995; Panganiban, 2011]. Zudem besitzt uPA abhängig vom uPAR einen Einfluss auf den Apoptoseinduktor p53. Wird dieser hochreguliert (folglich hochreguliert: PAI-1, herunterreguliert: uPA, uPAR) kommt es zur Apoptose. Die Suppression von p53 (folglich hochreguliert: uPA, uPAR, herunterreguliert: PAI-1) führt er zu einer Proliferation im Alveolarepithel [Shetty, 2008]. Dazu passend ist auch der positive Effekt von SPUC bei früher Trangenaktivierung ab Tag 0, da dies mit dem Ablauf der Apoptose nach Bleomycingabe korreliert.



## 6. Zusammenfassung

Die interstitiellen Lungenerkrankungen spielen in der Pneumologie eine wichtige Rolle. Als wichtiger und häufiger Vertreter dieser Erkrankungsgruppe ist die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) zu sehen. Die Ursachen und der Pathomechanismus der IPF sind noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand intensiver Forschung. Aktuell geht man von einer chronischen Schädigung der alveolären Typ II Zellen mit einer fehlgesteuerten Wundheilungsreaktion aus. Hierbei kommt es zu einer Anreicherung von Fibroblasten mit gesteigerter Sekretion und Deposition von Extrazellulärmatrix. In Folge kommt es zu einer Verminderung der Lungencompliance, einer Verbreiterung der Septen und einer Verminderung des Gasaustausches durch die längere Diffusionsstrecke.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Störung der alveolären Hämostase bei der IPF auftreten mit einer Verschiebung zu Gunsten prokoagulatorischer und antifibrinolytischer Faktoren. Um eine Korrektur der gestörten Hämostasebalance mit Verschiebung zu Gunsten fibrinolytischer Faktoren zu erreichen, wurde das SPUC-Fusionsprotein entwickelt, welches aus einem Surfactant-Protein-B-Anteil und einem Urokinase-Anteil besteht. Von unserer Arbeitsgruppe wurden auch transgene Mäuse generiert, die dieses Protein tetrazyklinabhängig in alveolar Typ II Zellen synthetisieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss einer SPUC Expression auf die Entstehung und Progression einer Fibrose im Mausmodell der bleomycininduzierten Lungenfibrose untersucht. Hierbei ging es v.a. um die Frage, ob es Unterschiede im Verlauf der Fibrose oder in Bezug auf das Überleben der Tiere gibt, wenn die Transgenaktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt um somit eine Aussage über einen möglichen optimalen Therapiezeitpunkt treffen zu können.

Wir konnten zeigen, dass die frühe Transgenaktivierung ab Tag 0 zu einer verbesserten Überlebensrate, einer Verbesserung der Lungenfunktion und einer Reduktion biochemischer und histologischer Fibrosezeichen führte.

Bei späterer Transgenaktivierung nach intratrachealer Bleomycinapplikation waren die therapeutischen Effekte jedoch deutlich geringer (ab Tag 4) oder aber so gut wie gar nicht mehr (ab Tag 16) ausgebildet.

Nach den Ergebnissen unserer Studie ist also der größte Nutzen einer SPUC Überexpression in der Zeit der maximalen Apoptoseneigung des Alveolarepithels

post Bleomycin zu beobachten und dies ist konsistent mit den anti-apoptotischen Funktionen von SPUC.

## Summary

Interstitial lung diseases (ILD) play an important role in the current discourse of pulmonology. The idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an important and frequent representative in this group of illnesses. The cause and the underlying pathomechanisms for IPF are yet not fully resolved and matter of intensive research. Currently, IPF is assumed to result from a chronic injury of the alveolar type II cells with a misguided wound healing reaction. Accumulation of fibroblasts in combination with increased secretion and deposition of extracellular matrix result in a structural remodelling of the lung parenchyma. As a consequence, this leads to a reduction of the lung compliance, an increase in septal thickness and a decrease of gasexchange because of the longer diffusion course.

Numerous studies have shown that an imbalance of the alveolar hemostasis with increased procoagulant and reduced fibrinolytic activities is a pathogenetical principle of the IPF. To achieve a correction of the disturbed hemostatic balance in favour of increased fibrinolysis of surfactant-containing fibrin clots, the SPUC- fusion- protein was developed, which consists of a surfactant-protein-B- and a urokinase-part. In our workgroup, transgenic mice were generated which conditionally express this protein tetracycline-dependent in alveolar type II cells.

In the context of this dissertation it was investigated how SPUC-expression influences the development and progression of fibrosis by using the bleomycin induced mouse model. The key issue was to find out whether there are differences in the development of the fibrosis or the survival of the mice if the activation of the transgenes occurs at different timepoints, in order to identify the optimal timeframe for therapy.

An early activation of transgenes (day 0) improved survival and lung function and also lead to an improvement of biochemical and histological signs of fibrosis.

An activation of transgenes at a later timepoint after an intratracheal application of Bleomycin resulted in significantly lower (day 4) or marginal (day 16) therapeutic effects.

Thus, according to the results of our study, the greatest benefit of SPUC overexpression is observed in the time of maximal apoptosis of the alveolar epithelium post bleomycin and this is consistent with the anti-apoptotic functions of SPUC.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
AEC	<i>alveolar epithelial cell</i>
AG	Arbeitsgemeinschaft
AIP	<i>acute interstitial pneumonia</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATS	<i>american thoracic society</i>
BAL	bronchioalveoläre Lavage
BOOP	<i>bronchiolitis obliterans organizing pneumonia</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL	<i>chemokine ligand</i>
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
COP	cryptogen organisierte Pneumonie
d	<i>day</i>
DAD	<i>diffuse alveolar destruction</i>
DIP	desquamative interstitielle Pneumonie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DOX	Doxyzyklin
DPLD	diffuse Lungenparenchymerkrankung
DPPC	Dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin
EAA	Exogen allergische Alveolitis
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	<i>european respiratory society</i>
Extr.	extrinsisch
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FVC	Forcierte expiratorische Vitalkapazität
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls

GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HR-CT	<i>high resolution – computertomographie</i>
IIP	<i>idiopathic interstitial pneumonia</i>
IL	Interleukin
ILD	<i>interstitial lung disease</i>
i.p.	intraperitoneal
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
IRDS	<i>infant respiratory distress syndrome</i>
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
LIP	lymphoide interstitielle Pneumonie
LOXL	<i>lysyl oxidase-like</i>
LSA	<i>Large Surfactant Aggregates</i>
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mN	Millinewton
MUC5B	Mucin-5-B
n	<i>number</i>
nm	Nanometer
NSIP	nichtspezifische idiopathische interstitielle Pneumonie
OP	<i>organizing pneumonia</i>
p	<i>propability</i>
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>

PAR	<i>protease activated receptor</i>
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
RB	<i>respiratory bronchiolitis</i>
rtTA	<i>reverse tetracyclin transaktivator</i>
Smad	<i>Drosophilaprotein, mothers against decapentaplegic</i>
SP-A-D	<i>Surfactant Protein A-D</i>
spez.	<i>spezifisch</i>
SPUC	<i>surfactant protein B urokinase conjugate</i>
Surfactant	<i>surface active agent</i>
T $\beta$ R	<i>threonin kinase rezeptor type</i>
TERC	<i>telomerase RNA component</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TF	<i>tissue factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteasis</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
UIP	<i>usual interstitial pneumonia</i>
u-PA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
u-PAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
VATS	<i>videoassistierte Thorakoskopie</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vit.	<i>Vitamin</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

## 8. Darstellungsverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1: Klassifikation der Diffus Parenchymatösen Lungenerkrankungen	S. 3
Abb. 2: Diagnoseprozess bei Diffus Parenchymatösen Lungenerkrankungen	S. 4
Abb. 3: Pathomechanistisches Konzept zur Entstehung der Lungenfibrose	S.14
Abb. 4: Pathogenetische Sequenzen der Fibroseentwicklung und mögliche Therapieansätze	S.16
Abb. 5: Zusammensetzung der pulmonalen Surfactant	S.18
Abb. 6: Surfactantproteine	S.18
Abb. 7: Schematische Übersicht über Gerinnungskaskade und Fibrinolyse	S.25
Abb. 8: Fibrinolyse: Umwandlung von Plasminogen in Plasmin	S.26
Abb. 9: Struktur der „Single-chain“ und „Two-chain“ Urokinase	S.28
Abb. 10: Pathophysiologisches Konzept der Interaktion von Gerinnung und Surfactant bei der Fibroseentstehung	S.31
Abb. 11: Kreuzungsschema zur Generierung doppelt transgener SPUC-Mäuse	S.35
Abb. 12: Bildmorphometrische Analyse eines histologischen Schnittes	S.47
Abb. 13: Überlebensrate der SPUC Mäuse im Bleomycinmodell dargestellt in Prozent	S.51
Abb. 14: Gewichtsänderung der SPUC Mäuse im Bleomycin Modell	S.52
Abb. 15: Lunge einer gesunden Maus aus der Kontrollgruppe ohne Bleomycinexposition, Links HE-Färbung, rechts Masson-Goldner-Färbung jeweils 2-fach, 10-fach und 20-fach vergrößert	S.54
Abb. 16: Lunge einer Maus aus der Referenzgruppe (SPUC Maus ohne Transgenaktivierung) an Tag 28 nach Bleomycinapplikation. Links HE-Färbung, rechts Masson-Goldner-Färbung jeweils 2-fach, 10-fach und 20-fach vergrößert.	S.55
Abb. 17: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung an Tag 0 nach Bleomycinapplikation. Links HE-Färbung, rechts Masson-Goldner-Färbung jeweils 2-fach, 10-fach und 20-fach vergrößert.	S.56
Abb. 18: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung an Tag 4 nach Bleomycinapplikation. Links HE-Färbung, rechts jeweils Masson-Goldner-Färbung jeweils 2-fach, 10-fach und 20-fach vergrößert.	S.57

Abb. 19: Lunge einer SPUC-Maus mit Transgenaktivierung an Tag 16 nach Bleomycinapplikation. Links HE-Färbung, rechts Masson-Goldner-Färbung jeweils 2-fach, 10-fach und 20-fach vergrößert.	S.58
Abb. 20: Mittlere Septendicke und mittlere Alveolengröße	S.60
Abb. 21: Dichteverteilung der Septendicke und der Alveolengröße	S.62
Abb. 22: Zelldifferenzierung	S.63
Abb. 23: Compliancemessung der Lungen an Tag 28	S.65
Abb. 24: Hydroxyprolinegehalt im Lungengewebe an Tag 28	S.66

## **Tabellen**

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die Klinik der IIPs	S. 5
Tabelle 2: Übersicht der Gerinnungsfaktoren	S.24



## 9. Literaturverzeichnis

**Adamson IY, Young L, Bowden DH. 1988.** Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 130:377–383.

**American Thoracic Society. 2000.** Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:646–664.

**American Thoracic Society/European Respiratory Society. 2000.** International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:277–304.

**Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. 2007.** Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293:L259-71.

**Armanios, Mary Y.; Chen, Julian J-L; Cogan, Joy D.; Alder, Jonathan K.; Ingersoll, Roxann G.; Markin, Cheryl et al. (2007).** Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The New England journal of medicine* 356 (13), S. 1317–1326. DOI: 10.1056/NEJMoa066157.

**Attisano L, Wrana JL. 2002.** Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646–1647.

**Bachofen M, Weibel ER. 1982.** Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinics in chest medicine* 3:35–56.

**Behr J. 2013.** The diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Deutsches Ärzteblatt international* 110:875–881.

**Behr J, Costabel U, Worth H. 2011.** Stellungnahme der DGP zur Pressemitteilung des National Heart, Lung, and Blood Institute zur PANTHER-Studie bei IPF-Patienten vom 21.10.2011. *Pneumologie* (Stuttgart, Germany) 65:724–725.

**Behr J, Günther A, Ammenwerth W, Bittmann I, Bonnet R, Buhl R, Eickelberg O, Ewert R, Gläser S, Gottlieb J, Grohé C, Kreuter M, Kroegel C, Markart P, Neurohr C, Pfeifer M, Prasse A, Schönfeld N, Schreiber J, Sitter H, Theegarten D, Theile A, Wilke A, Wirtz H, Witt C, Worth H, Zabel P, Müller-Quernheim J, Costabel U. 2013.** S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie* 67:81–111.

**Besnard, Valérie; Matsuzaki, Yohei; Clark, Jean; Xu, Yan; Wert, Susan E.; Ikegami, Machiko et al. (2010).** Conditional deletion of *Abca3* in alveolar type II cells alters surfactant homeostasis in newborn and adult mice. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 298 (5), L646-59. DOI: 10.1152/ajplung.00409.2009.

**Bettencourt PE, Del Bono, E A, Spiegelman D, Hertzmark E, Murphy RL. 1994.** Clinical utility of chest auscultation in common pulmonary diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 150:1291–1297.

**Bigby TD, Allen D, Leslie CG, Henson PM, Cherniack RM. 1985.** Bleomycin-induced lung injury in the rabbit. Analysis and correlation of bronchoalveolar lavage, morphometrics, and fibroblast stimulating activity. *The American review of respiratory disease* 132:590–595.

**Blasi F, Sidenius N. 2010.** The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Letters* 584:1923–1930.

**Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. 2011.** Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis and rheumatism* 63:1416–1425.

**Borensztajn K, Crestani B, Kolb M. 2013.** Idiopathic pulmonary fibrosis: from epithelial injury to biomarkers--insights from the bench side. *Respiration; international review of thoracic diseases* 86:441–452.

**Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schroten H, Mildenerger E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griesse M, Schmitz G. 2006.** Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174:571–580.

**Bridges JP, Wert SE, Noguee LM, Weaver TE. 2003.** Expression of a human surfactant protein C mutation associated with interstitial lung disease disrupts lung development in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 278:52739–52746.

**Brozmanova M, Hanacek J, Tatar M, Szepe P. 2004.** The influence of hyperoxia on cough reflex intensity in guinea pigs treated with bleomycin. *Bratislavské lekárske listy* 105:65–71.

**Burkhardt A. 1989.** Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *The American review of respiratory disease* 140:513–524.

**Cameron HS, Somaschini M, Carrera P, Hamvas A, Whitsett JA, Wert SE, Deutsch G, Noguee LM. 2005.** A common mutation in the surfactant protein C gene associated with lung disease. *The Journal of pediatrics* 146:370–375.

**Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympny PA, Du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. 1997.** Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *The American journal of pathology* 150:981–991.

**Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, Brown KK, Kaner RJ, King TE, Lasky JA, Loyd JE, Noth I, Olman MA, Raghu G, Roman J, Ryu JH, Zisman DA, Hunninghake GW, Colby TV, Egan JJ, Hansell DM, Johkoh T, Kaminski N, Kim DS, Kondoh Y, Lynch DA, Müller-Quernheim J, Myers JL, Nicholson AG, Selman M, Toews GB, Wells AU, Martinez FJ. 2007.** Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176:636–643.

**Costabel U, Albera C, Bradford WZ, Hormel P, King TE, Noble PW, Sahn SA, Valeyre D, du Bois, Roland M. 2014.** Analysis of lung function and survival in RECAP: An open-label extension study of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* 31:198–205.

**Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. 1994.** The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:967–972.

**Crooks MG, Hart SP. 2015.** Coagulation and anticoagulation in idiopathic pulmonary fibrosis. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society* 24:392–399.

**Crouch E, Wright JR. 2001.** Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annual review of physiology* 63:521–554.

**Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. 1981.** Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am. J. Med.* 70:542–568.

**Dospil A, Helferich S, Horn F. 2005.** *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium; [Klinik, Stoffwechsel, Zellbiologie, Molekularbiologie, Signaltransduktion, Chemie].* Stuttgart [u.a.]: Thieme. XVIII, 624 S.

**du Bois, Roland M, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, Lancaster L, Noble PW, Raghu G, Sahn SA, Szwarcberg J, Thomeer M, Valeyre D, King TE. 2011.** Ascertainment of individual risk of mortality for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184:459–466.

**Eickelberg O. 2001.** Endless healing: TGF- $\beta$ , SMADs, and fibrosis. *FEBS Letters* 506:11–14.

**Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. 1996.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *The Journal of clinical investigation* 97:232–237.

**Esmon CT. 2008.** Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 61:122–131.

**Fehrenbach H. 2001.** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research* 2:33–46.

**Finer NN. 2004.** Surfactant use for neonatal lung injury: beyond respiratory distress syndrome. *Paediatric respiratory reviews* 5 Suppl A:S289-97.

**Furstoss O, Manes G, Roche S. 2002.** Cyclin E and cyclin A are likely targets of Src for PDGF-induced DNA synthesis in fibroblasts. *FEBS Lett.* 526:82–86.

**Garmany TH, Moxley MA, White FV, Dean M, Hull WM, Whitsett JA, Nogee LM, Hamvas A. 2006.** Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatric research* 59:801–805.

**Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. 1999.** Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after

onset of ARDS. American journal of respiratory and critical care medicine 160:1843–1850.

**Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith, C J P, West J, Tata LJ. 2006.** Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. Thorax 61:980–985.

**Griese M. 1999.** Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. The European respiratory journal 13:1455–1476.

**Griese M, Schumacher S, Tredano M, Steinecker M, Braun A, Guttentag S, Beers MF, Bahuau M. 2005.** Expression profiles of hydrophobic surfactant proteins in children with diffuse chronic lung disease. Respiratory research 6:80.

**Gross TJ, Hunninghake GW. 2001.** Idiopathic pulmonary fibrosis. N. Engl. J. Med. 345:517–525.

**Günther A, Enke B, Markart P, Hammerl P, Morr H, Behr J, Stähler G, Seeger W, Grimminger F, Leconte I, Roux S, Ghofrani HA. 2007.** Safety and Tolerability of bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: an open label study. Eur Respir J 29:713-719, 2007

**Gunther A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W. 1994.** Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity. The American journal of physiology 267: L618-24.

**Gunther A, Kalinowski M, Rosseau S, Seeger W. 1995.** Surfactant incorporation markedly alters mechanical properties of a fibrin clot. American journal of respiratory cell and molecular biology 13:712–718.

**Gunther A, Markart P, Kalinowski M, Ruppert C, Grimminger F, Seeger W. 1999.** Cleavage of surfactant-incorporating fibrin by different fibrinolytic agents. Kinetics of lysis and rescue of surface activity. American journal of respiratory cell and molecular biology 21:738–745.

**Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. 1996.** Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *American journal of respiratory and critical care medicine* 153:176–184.

**Günther A, Lübke N, Ermert M, Schermuly RT, Weissmann N, Breithecker A, Markart P, Ruppert C, Quanz K, Ermert L, Grimminger F, Seeger W. 2003.** Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168:1358–1365.

**Günther A, Mosavi P, Ruppert C, Heinemann S, Temmesfeld B, Velcovsky HG, Morr H, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. 2000.** Enhanced tissue factor pathway activity and fibrin turnover in the alveolar compartment of patients with interstitial lung disease. *Thromb. Haemost.* 83:853–860.

**Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. 2001.** Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respiratory research* 2:353–364.

**Günther A, Schmidt R, Feustel A, Meier U, Pucker C, Ermert M, Seeger W. 1999a.** Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in large surfactant aggregates. *Experimental and clinical studies. American journal of respiratory and critical care medicine* 159:244–251.

**Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W. 1999b.** Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 14:565–573.

**Gurujeyalakshmi G, Hollinger MA, Giri SN. 1999.** Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *The American journal of physiology* 276: L311-8.

**Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. 2002.** TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J. Immunol.* 168:6470–6478.

**Han S, Mallampalli RK. 2015.** The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Annals of the American Thoracic Society* 12:765–774.

**Hattori N, Degen JL, Sisson TH, Liu H, Moore BB, Pandrangi RG, Simon RH, Drew AF. 2000.** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *The Journal of clinical investigation* 106:1341–1350.

**Hermansky F, Pudlak P. 2016.** Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood.* 1959;14(2):162-169. *Blood* 127:1731.

**Hernández-Rodríguez NA, Cambrey AD, Harrison NK, Chambers RC, Gray AJ, Southcott AM, duBois RM, Black CM, Scully MF, McAnulty RJ. 1995.** Role of thrombin in pulmonary fibrosis. *Lancet* 346:1071–1073.

**Herold G. 2012. Innere Medizin 2012:** Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Selbstverl. 960 p.

**Hildenbrand R, Glienke W, Magdolen V, Graeff H, Stutte HJ, Schmitt M. 1998.** Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochemistry and cell biology* 110:27–32.

**Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thöne-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F. 2000.** Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23:19–26.



**Honda Y, Tsunematsu K, Suzuki A, Akino T. 1988.** Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Lung* 166:293–301.

**Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G, Laurent GJ, Chambers RC. 2001.** Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology* 159:1383–1395.

**Hughes DA, Haslam PL. 1989.** Changes in phosphatidylglycerol in bronchoalveolar lavage fluids from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Chest* 95:82–89.

**Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. 1986.** The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *The Journal of biological chemistry* 261:3486–3489.

**Idell S, Gonzalez KK, MacArthur CK, Gillies C, Walsh PN, McLarty J, Thrall RS. 1987.** Bronchoalveolar lavage procoagulant activity in bleomycin-induced lung injury in marmosets. Characterization and relationship to fibrin deposition and fibrosis. *The American review of respiratory disease* 136:124–133.

**Idell S, James KK, Gillies C, Fair DS, Thrall RS. 1989.** Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage of rats with oleic acid and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *The American journal of pathology* 135:387–399.

**Idell S, Koenig KB, Fair DS, Martin TR, McLarty J, Maunder RJ. 1991.** Serial abnormalities of fibrin turnover in evolving adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* 261: L240-8.

**Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A. 1997.** Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 156:631–636.

**Johansson J, Curstedt T. 1997.** Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *European journal of biochemistry / FEBS* 244:675–693.

**Jones HA, Schofield JB, Krausz T, Boobis AR, Haslett C. 1998.** Pulmonary fibrosis correlates with duration of tissue neutrophil activation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158:620–628.

**Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, Zuo F, Griffiths MJ, Morris D, Huang X, Sheppard D, Heller RA. 2000.** Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1778–1783.

**Katzenstein AL, Myers JL. 1998.** Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1301–1315.

**Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou Y, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi K, Kato M, Miyazono K. 1999.** Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 886:73–82.

**Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid, Kenneth B M, Madan T, Chakraborty T. 2006.** Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular immunology* 43:1293–1315.

**Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle R-M, Seeger W, Weaver TE, Guenther A. 2008.** Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178:838–846.

**Kotani I, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. 1995.** Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thrombosis research* 77:493–504.

**Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, Sasaki H. 2008.** Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 128 (3): 1475–1482.

**Kuhn C, Boldt J, King TE, Crouch E, Vartio T, McDonald JA. 1989.** An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:1693–1703.

**Lawson, William E.; Crossno, Peter F.; Polosukhin, Vasiliy V.; Roldan, Juan; Cheng, Dong-Sheng; Lane, Kirk B. et al. (2008):** Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF. association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294 (6), L1119-26. DOI: 10.1152/ajplung.00382.2007.

**Ley B, Collard HR. 2013.** Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol* 5:483–492.

**Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS, Poletti V, Buccioli M, Elicker BM, Jones KD, King TE, Collard HR. 2012.** A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Annals of internal medicine* 156:684–691.

**Loof TG, Deicke C, Medina E. 2014.** The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4:128.

**Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Kuschinsky G. 2010.** *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen.* Stuttgart, New York, NY: Thieme. XIX, 666 S.

**Mahavadi P, Korfei M, Henneke I, Liebisch G, Schmitz G, Gochuico BR, Markart P, Bellusci S, Seeger W, Ruppert C, Guenther A. 2010.** Epithelial stress and apoptosis underlie Hermansky-Pudlak syndrome-associated interstitial pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182:207–219.

**Maitra, Meenakshi; Wang, Yongyu; Gerard, Robert D.; Mendelson, Carole R.; Garcia, Christine Kim (2010).** Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (29), S. 22103–22113. DOI: 10.1074/jbc.M110.121467

**Markart P, Ruppert C, Grimminger F, Seeger W, Günther A. 2003.** Fibrinolysis-inhibitory capacity of clot-embedded surfactant is enhanced by SP-B and SP-C. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L69-76.

**Martinez FJ, de Andrade, Joao A, Anstrom KJ, King TE, Raghu G. 2014.** Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 370:2093–2101.

**McCormack FX, King TE, JR, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. 1991.** Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *The American review of respiratory disease* 144:160–166.

**Mulugeta S, Nureki S-I, Beers MF. 2015.** Lost after translation: insights from pulmonary surfactant for understanding the role of alveolar epithelial dysfunction and cellular quality control in fibrotic lung disease. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309: L507-25.

**Nagase H, Woessner JF. 1999.** Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491–21494.

**Nakatani Y, Nakamura N, Sano J, Inayama Y, Kawano N, Yamanaka S, Miyagi Y, Nagashima Y, Ohbayashi C, Mizushima M, Manabe T, Kuroda M, Yokoi T, Matsubara O. 2000.** Interstitial pneumonia in Hermansky-Pudlak syndrome: significance of florid foamy swelling/degeneration (giant lamellar body degeneration) of type-2 pneumocytes. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 437:304–313.

**Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. 1995.** Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *The Journal of biological chemistry* 270:603–611.

**Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. 2012.** Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society* 21:355–361.

**Newton, Chad A.; Batra, Kiran; Torrealba, Jose; Kozlitina, Julia; Glazer, Craig S.; Aravena, Carlos et al. (2016).** Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. In: *The European respiratory journal* 48 (6), S. 1710–1720. DOI: 10.1183/13993003.00308-2016.

**Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE, Lancaster L, Sahn SA, Szwarcberg J, Valeyre D, du Bois, Roland M. 2011.** Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet (London, England)* 377:1760–1769.

**Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. 1994.** A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *The Journal of clinical investigation* 93:1860–1863.

**Nogee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whitsett JA. 2000.** Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *American journal of respiratory and critical care medicine* 161:973–981.

**Noth I, Anstrom KJ, Calvert SB, Andrade J, Flaherty KR, Glazer Craig, Kaner RJ, Olman MA. 2012.** A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186: 88–95.

**Ohshimo S, Bonella F, Cui A, Beume M, Kohno N, Guzman J, Costabel U. 2009.** Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:1043–1047.

**Olman MA, Mackman N, Gladson CL, Moser KM, Loskutoff DJ. 1995.** Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *The Journal of clinical investigation* 96:1621–1630.

**Organ L, Bacci B, Koumoundouros E, Barcham G, Milne M, Kimpton W, Samuel C, Snibson K. 2015.** Structural and functional correlations in a large animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *BMC pulmonary medicine* 15:81.

**Ozawa Y, Suda T, Naito T, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K. 2009.** Cumulative incidence of and predictive factors for lung cancer in IPF. *Respirology (Carlton, Vic.)* 14:723–728.

**Panganiban RAM, Day RM. 2011.** Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta pharmacologica Sinica* 32: 12–20.

**Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE, JR. 1990.** Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *The American journal of medicine* 88:396–404.

**Pantelidis P, McGrath DS, Southcott AM, Black CM, du Bois, R M. 2001.** Tumour necrosis factor- $\alpha$  production in fibrosing alveolitis is macrophage subset specific. *Respir. Res.* 2:365–372.

**Pappot H, Gårdsvoll H, Rømer J, Pedersen AN, Grøndahl-Hansen J, Pyke C, Brünner N. 1995.** Plasminogen activator inhibitor type 1 in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 376:259–267.

**Pardo A, Selman M. 2002.** Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:1534–1538.

**Parzen, Emanuel.** On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *The Annals of Mathematical Statistics* 33 (1962), Nr. 3, S. 1065 – 1076

**Peres e Serra, André, Parra ER, Eher E, Capellozzi VL. 2006.** Nonhomogeneous immunostaining of hyaline membranes in different manifestations of diffuse alveolar damage. *Clinics (São Paulo, Brazil)* 61:497–502.

**Petrosyan F, Culver DA, Reddy AJ. 2015.** Role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis: a retrospective study. *BMC pulmonary medicine* 15:70.

**Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA. 1989.** Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 8:75–86.

**Ploplis VA, Wilberding J, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, Deford ME, Rosen ED, Castellino FJ. 2000.** A total fibrinogen deficiency is compatible with the development of pulmonary fibrosis in mice. *The American journal of pathology* 157:703–708.

**Raghu G, Anstrom KJ, King TE, Lasky JA, Martinez FJ. 2012.** Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine* 366:1968–1977.

**Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier J-F, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schünemann HJ. 2011.** An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. American journal of respiratory and critical care medicine 183:788–824.

**Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. 2012.** Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA 307:2526–2533.

**Ray P, Tang W, Wang P, Homer R, Kuhn C, Flavell RA, Elias JA. 1997.** Regulated overexpression of interleukin 11 in the lung. Use to dissociate development-dependent and -independent phenotypes. The Journal of clinical investigation 100:2501–2511.

**Renz-Polster H, editor. 2008.** Basislehrbuch Innere Medizin: Kompakt, greifbar, verständlich. München, Jena: Elsevier, Urban & Fischer. XX, 1355 S.

**Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, Nicholson AG, Brown K. 2011.** Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. The New England journal of medicine 365: 1079–1087

**Richeldi L, Cottin V, Flaherty KR, Kolb M, Inoue Y, Raghu G, Taniguchi H. 2014.** Design of the INPULSIS™ Trials: Two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med 2014 Jul; 108 (7):1023-30.

**Robinson PC, Watters LC, King TE, Mason RJ. 1988.** Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid phospholipids. The American review of respiratory disease 137:585–591.



**Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. 1994.** Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8:957–967.

**Ruppert C, Mahavadi P, Wygrecka M, Weaver TE, Magdolen V, Idell S, Preissner KT, Seeger W, Günther A, Markart P. 2008.** Recombinant production of a hybrid plasminogen activator composed of surfactant protein B and low-molecular-weight urokinase. *Thrombosis and haemostasis* 100:1185–1192.

**Ruppert C, Markart P, Schmidt R, Grimminger F, Seeger W, Lehr C-M, Günther A. 2003.** Chemical crosslinking of urokinase to pulmonary surfactant protein B for targeting alveolar fibrin. *Thrombosis and haemostasis* 89:53–64.

**Schermuly RT, Günther A, Ermert M, Ermert L, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. 2001.** Conebulization of surfactant and urokinase restores gas exchange in perfused lungs with alveolar fibrin formation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280: L792-800.

**Schmidt R, Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walmrath D, Seeger W, Guenther A. 2007.** Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respiratory research* 8:55.

**Schmidt R, Meier U, Markart P, Grimminger F, Velcovsky HG, Morr H, Seeger W, Gunther A. 2002.** Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283: L1079-85.

**Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther A. 2001.** Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163:95–100.

**Schmidt RF. Physiologie des Menschen.** [S.l.]: Springer.

**Scotton CJ, Krupiczko MA, Königshoff M, Mercer PF, Lee, Y C Gary, Kaminski N, Morser J, Post JM, Maher TM, Nicholson AG, Moffatt JD, Laurent GJ, Derian CK, Eickelberg O, Chambers RC. 2009.** Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *The Journal of clinical investigation* 119:2550–2563.

**Seeger W, Elssner A, Günther A, Krämer HJ, Kalinowski HO. 1993.** Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9:213–220.

**Seger N, Soll R. 2009.** Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD007836.

**Selman M, King TE, Pardo A. 2001.** Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134:136–151.

**Shetty S, Kumar A, Johnson AR, Pueblitz S, Holiday D, Raghu G, Idell S. 1996.** Differential expression of the urokinase receptor in fibroblasts from normal and fibrotic human lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15:78–87.

**Shetty S, Padijnayayveetil J, Tucker T, Stankowska D, Idell S. 2008.** The fibrinolytic system and the regulation of lung epithelial cell proteolysis, signaling, and cellular viability. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 295: L967-75.

**Silbernagl S, Despopoulos A. 2003.** *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart, New York: Thieme. XIII, 436 S.

**Sisson TH, Hanson KE, Subbotina N, Patwardhan A, Hattori N, Simon RH. 2002.** Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortality after lung injury in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283: L1023-32.

**Sisson TH, Simon RH. 2007.** The plasminogen activation system in lung disease. *Current drug targets* 8:1016–1029.

**Spagnolo P, Rossi G, Cavazza A. 2014.** Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and its clinical implications. *Expert review of clinical immunology* 10:1005–1017.

**Specks U, Nerlich A, Colby TV, Wiest I, Timpl R. 1995.** Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1956–1964.

**Stepanova VV, Tkachuk VA. 2002.** Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry. Biokhimiia* 67:109–118.

**Strieter RM. 2005.** Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 128:526S-532S.

**Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M. 2000.** Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:1949–1956.

**Sun A-P, Ohtsuki Y, Fujita J, Ishida T, Yoshinouchi T, Kohno N. 2003.** Immunohistochemical characterisation of pulmonary hyaline membrane in various types of interstitial pneumonia. *Pathology* 35:120–124.

**Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli V, Greisen G, Plavka R, Saugstad OD, Simeoni U, Speer CP, Valls-I-Soler A, Halliday H. 2007.** European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *Journal of perinatal medicine* 35:175–186.

**Takeda Y, Tsujino K, Kijima T, Kumanogoh A. 2014.** Efficacy and safety of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Patient preference and adherence* 8:361–370.

**Thomas AQ, Lane K, Phillips J, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. 2002.** Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165:1322–1328.

**Thrall RS, Swendsen CL, Shannon TH, Kennedy CA, Frederick DS, Grunze MF, Sulavik SB. 1987.** Correlation of changes in pulmonary surfactant phospholipids with compliance in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *The American review of respiratory disease* 136:113–118.

**Tkachuk V, Stepanova V, Little PJ, Bobik A. 1996.** Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 23:759–765.

**Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D. 2013.** An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188:733–748.

**Treiber U. 2008.** Urogenitale Tumoren: [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. München [i.e. Germering], Wien, New York, NY: Zuckschwerdt. XIV, 355 S.

**Tryka AF, Wert SE, Mazursky JE, Arrington RW, Noguee LM. 2000.** Absence of lamellar bodies with accumulation of dense bodies characterizes a novel form of congenital surfactant defect. *Pediatric and developmental pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 3:335–345.

**Vaandrager AB, van Golde, L M. 2000.** Lung surfactant proteins A and D in innate immune defense. *Biology of the neonate* 77 Suppl 1:9–13.

**Verrecchia F, Tacheau C, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauviel A. 2001.** Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene* 20:2205–2211.

**Vorbroker DK, Profitt SA, Noguee LM, Whitsett JA. 1995.** Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *The American journal of physiology* 268: L647-56.

**Wang L, Wang Y, Yang T, Guo Y, Sun T. 2015.** Angiotensin-Converting Enzyme 2 Attenuates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 36:697–711.

**Wauer RR. 2004.** Surfactanttherapie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie; 44 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Thieme. XI, 251 S.

**Wilberding JA, Ploplis VA, McLennan L, Liang Z, Cornelissen I, Feldman M, Deford ME, Rosen ED, Castellino FJ. 2001.** Development of pulmonary fibrosis in fibrinogen-deficient mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 936:542–548.

**Wild JS, Hyde DM, Giri SN. 1994.** Dose and regimen effects of poly ICLC, an interferon inducer, in a multi-dose bleomycin model of interstitial pulmonary fibrosis. *Pharmacology & toxicology* 75:42–48.

**Wygrecka M, Jablonska E, Guenther A, Preissner KT, Markart P. 2008.** Current view on alveolar coagulation and fibrinolysis in acute inflammatory and chronic interstitial lung diseases. *Thrombosis and haemostasis* 99:494–501.

**Wygrecka M, Markart P, Ruppert C, Kuchenbuch T, Fink L, Bohle RM, Grimminger F, Seeger W, Günther A. 2004.** Compartment- and cell-specific expression of coagulation and fibrinolysis factors in the murine lung undergoing inhalational versus intravenous endotoxin application. *Thrombosis and haemostasis* 92:529–540.

**Wygrecka M, Markart P, Ruppert C, Petri K, Preissner KT, Seeger W, Guenther A. 2007.** Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs. *The European respiratory journal* 29:1105–1114.

**Zappala CJ, Latsi PI, Nicholson AG, Colby TV, Cramer D, Renzoni EA, Hansell DM, du Bois, R M, Wells AU. 2010.** Marginal decline in forced vital capacity is associated with a poor outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal* 35:830–836.

## **10. Publikationsverzeichnis**

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Diese haben mich immer in allen Lebenslagen unterstützt und mir das Studium überhaupt erst ermöglicht. Sie haben mich zu dem gemacht, der ich jetzt bin. Zudem danke ich meiner Schwester und meiner weiteren Familie für die Unterstützung.

Weiter möchte ich Kristina danken, die insbesondere in der letzten Zeit, immer wieder für den nötigen Antrieb gesorgt hat.

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Günther für die Überlassung der Arbeit danken und der Möglichkeit diese zu verfassen.

Aus dem Tierlabor möchte ich insbesondere Ingrid und Steffi danken, die mich immer sehr unterstützt, mir geholfen und mich eingearbeitet haben. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Es war eine nette Zeit mit euch.

Clemens möchte ich für die Unterstützung während des Verfassens der Arbeit danken, für die Tipps und Hinweise bis hin zur unermüdlichen Suche nach Rechtschreibfehlern.



### **13. Tabellarischer Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.